

Die Richtigkeit der Analysenresultate wird weitgehend bestimmt durch die Güte des verwendeten Standardbleis (Homogenität und Richtigkeit der Gehaltsangabe). Die Homogenität wurde zu $< \pm 3\%$ gefunden, was auch durch die Werte in Tab. 3 bestätigt wird. Die Richtigkeit der Gehaltsangaben für das Standardblei wurde dagegen nicht überprüft, sie wird auf $< \pm 10\%$ geschätzt.

Kapazität: Mit der beschriebenen Methode lassen sich pro Tag 10–15 Proben vollständig analysieren, so dass auch grösseren Probezahlen in kurzer Zeit bestimmt werden können.

Herrn Dr. J. Patry und Herrn dipl. phys. S. Chakraborty wird für die wertvollen Diskussionen in der Programm-Testphase und Herrn M. Kühnle für seine wertvolle Hilfe bestens gedankt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Miller, F. J., et al., «Radioisotope and Radiation Applications Isotopic Methods of Examination and Authentication in Art and Archaeology», ORNL-IIC-21 (Okt. 1970).
- [2] Schubiger, A., «Instrumentelle Aktivierungsanalyse von Spurenelementen in römischen Bleigegenständen», Dissertation Universität Zürich, veröffentlicht als EIR-Bericht Nr. 214 (Juli 1972).
- [3] Wytttenbach, A., Schubiger, A., *Archaeometry*, im Druck.
- [4] Winiger, P., Huber, O. & Halter, J., *Helv. Phys. Acta*, **43**, 693 (1970).
- [5] Robinson, D. C., «A Computer Program for the Determination of Accurate γ -Line Intensities from Ge(Li)-Spectra», AERE-PG 144 (1969).
- [6] Wytttenbach, A., *J. Radioanal. Chem.* **8**, 335 (1971).
- [7] Currie, L. A., *Anal. Chem.* **40**, 586 (1968).
- [8] Bruninx, E., *Analyt. chim. Acta* **60**, 207 (1972).

66. Nucleoside und Nucleotide. Teil 4. Festphasensynthese von Oligonucleotiden an einem unlöslichen, makroporösen Träger¹⁾

von Remo Glaser, Urs Séquin und Christoph Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(28. 11. 72)

Summary. Insoluble, macroreticular, highly cross-linked polystyrene with projecting monomethoxytrityl chloride groups **4** was prepared and condensed with thymidine (T_d) as well as with 1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridone (II_d) to give the polymers **5** and **6** respectively, containing approximately 465 μ moles resp. 650 μ moles of bound nucleoside per gram of polymer. A standard procedure for removal of the products from the support is described. Condensation of the polymer-bound nucleosides **5** and **6**, respectively, with 3'-O-acetyl-thymidine-5'-phosphate (**7**) in the presence of mesitylenesulfonyl chloride (MS) and subsequent removal from the polymer yielded the dinucleoside phosphates T_d - T_d (**9**) and II_d - T_d (**11**) respectively.

Condensation of the polymer **8** with 3'-O-acetyl-thymidine-5'-phosphate (**7**) in the presence of MS and cleavage of the polymer linkage gave the trithymidine diphosphate (T_d - T_d - T_d) (**13**). Phosphorylation of the polymer-bound nucleosides **5** and **6** with β -cyanoethyl phosphate in presence of MS took place in 3'-position. Similarly the polymer-bound dinucleoside phosphates **8** and **10** gave **16** and **17** respectively.

¹⁾ Teil 3: s. [1].

1. Einleitung. – Bei der Synthese von kettenartigen Biopolymeren wie Polypeptiden, Polysacchariden und Polynucleotiden wiederholen sich bei jeder Verlängerung durch Kondensation gleiche Arbeitsgänge, wobei das neue Kondensationsprodukt jeweils durch zeitraubende Trennungsvorgänge isoliert werden muss. Die von *Merrifield* [2] für Polypeptide entwickelte Festphasensynthese («solid phase synthesis») hat beachtliche Erfolge zu verzeichnen (vgl. auch [3]). Demgegenüber ist die Synthese von Oligonucleotiden nach diesem Prinzip bisher weniger erfolgreich verlaufen.

Versuche von *Letsinger* [4] [5] mit einem unlöslichen «Popcorn»-Polystyrolträger, der mit einer Benzoylgruppe funktionalisiert wurde, führten unter anderem zu Trithymidin-diphosphat ($T_d-T_d-T_d$)²⁾. Das gleiche Oligodesoxyribonucleotid wurde auch von *Khorana* [6] und *Cramer* [7] synthetisiert, die jedoch im Gegensatz zu *Letsinger* einen löslichen Polystyrolträger und die Monomethoxytritylgruppe verwendeten. Ein unlöslicher, jedoch stark quellbarer Träger mit verschiedenen funktionellen Gruppen wurde von *Melby & Strobach* [8] wie auch von *Hayatsu* [9] eingesetzt. So synthetisierte *Hayatsu* ein Hexanucleotid, dessen Startnucleosid mittels einer Benzoylgruppe am Träger befestigt war. Das Startnucleosid wurde von *Melby & Strobach* über eine Monomethoxytritylgruppe mit dem Träger verknüpft und konnte so zu einem Pentanucleotid aufgebaut werden. *Cramer* hat die Idee der Unlöslichkeit des Trägers übernommen und einen starren, unquellbaren und makroporösen polymeren Träger mit einer Dimethoxytritylgruppe [10] hergestellt. Mit diesem neuen Trägertyp gelang ihm die Synthese des Hexanucleotids von Thymidin ($T_d-T_d-T_d-T_d-T_d-T_d$). Mit dem gleichen Träger, jedoch mit 2-(α -Pyridyl)-äthanol als funktionelle Gruppe, konnte er die Hexathymidylsäure synthetisieren [11]. In Abweichung von den bisherigen organischen Trägern verwendete *Köster* [12] einen Kieselgelträger mit Tritylgruppen. Die direkte Kondensation von Nucleosiden resp. Nucleotiden mit einem Chlorderivat des Kieselgels wurde ebenfalls versucht, war aber wenig erfolgreich, da die entstandenen Silicium-Sauerstoff- resp. -Phosphor-Bindungen sehr labil waren.

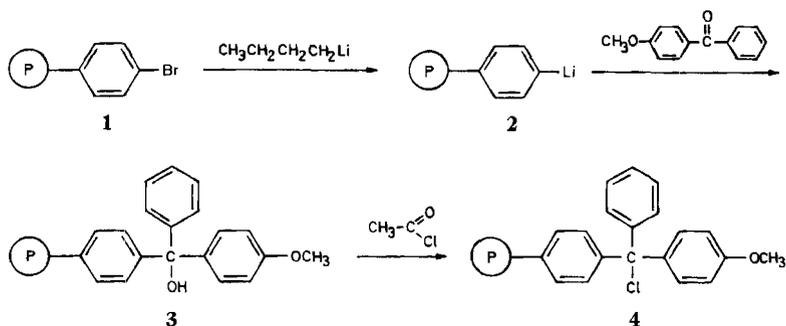
2. Der verwendete polymere Träger. – Die Abhängigkeit vom Lösungsmittel bei der Verwendung von löslichen oder stark quellbaren Trägern wird durch den Einsatz von starren und unlöslichen polymeren Trägern umgangen. Durch sie lassen sich auch Einschlüsse von Reagenzien, wie sie z. B. beim Fällen des löslichen Trägermaterials auftreten können, vermeiden. Für beide Trägertypen sind die Reaktionsdauern gleich lang. Die schlechte Benetzung des unlöslichen, unquellbaren Trägers in den verschiedenen Reaktionsschritten ist ein Nachteil. Die gleiche Schwierigkeit tritt bekanntlich auch bei den Ionenaustauscherharzen auf und wird dort durch die Verwendung eines Trägers mit makroporöser Struktur [13] überwunden. *Cramer* [10] [11] hat solche Träger für die Festphasensynthese von Oligonucleotiden verwendet und damit bemerkenswerte Resultate erzielt.

Auf Grund dieser Erfahrungen entschlossen wir uns, einen grossporigen und starren polymeren Träger, der mit einer Monomethoxytritylgruppe funktionalisiert ist, zu verwenden. Die Herstellung des Festkörpers, der für die spätere Einführung der Tritylgruppe Brom als reaktive funktionelle Gruppe enthielt, entsprach in polymerisationstechnischer Hinsicht der von *Braun* [14] angewandten Methode. Die Porosität³⁾ wurde analog zum Verfahren von *Kunin* [15] während der Polymerisation durch Zugabe von Decalin erzeugt. Zu diesem Zweck wurde eine Mischung von Styrol, *p*-Bromstyrol, Divinylbenzol und Decalin im Mol-Verhältnis 8:2:0,6:10 in einer

²⁾ Nomenklatur nach IUPAC-IUB Empfehlungen. Vgl. *Biochemistry* 9, 4022 (1970).

³⁾ *Ann. ber der Korrektur:* Vorläufige Untersuchungen mit Hilfe der Raster-Elektronenmikroskopie haben bisher keine eindeutigen Schlüsse über die Porengrösse erlaubt.

10proz. wässrigen Polyvinylalkohollösung mit 0,5 Mol-% (bezogen auf die Monomeren) Dibenzoylperoxid als Initiator polymerisiert. Das farblose Polymerisat, das in Form von Perlen mit einem Durchmesser von 0,06–0,6 mm anfiel, wies einen Bromgehalt von 1,5 mmol pro Gramm Polymer auf. Der Aufbau der Monomethoxytritylgruppe am Polymeren wurde nach einem modifizierten Verfahren, das *Melby & Strobach* [16] bei einem mit 1% Divinylbenzol vernetzten Poly-*p*-jodstyrol verwendet hatten, vorgenommen. Der Syntheseweg ist in Schema 1 zusammengefasst.

Schema 1⁴⁾

Mit einem Überschuss an 1-Butyllithium wurde das bromhaltige Polymer **1** in trockenem Benzol in das farblose Lithiumderivat **2** übergeführt, welches nicht isoliert wurde. Nach sorgfältigem Entfernen des überschüssigen 1-Butyllithiums entstand durch Umsetzung von **2** mit *p*-Methoxybenzophenon der Alkohol **3**. Das IR.-Spektrum des gelb gefärbten Polymeren **3** in KBr wies charakteristische Banden bei 3550, 1500, 1290 und 820 cm^{-1} auf. Die Methoxylbestimmung durch Spaltung von **3** mit HJ ergab einen Wert von 1,04 mmol pro Gramm des Polymeren. Da das Produkt bromfrei, aber der Methoxylwert kleiner als der ursprüngliche Bromgehalt des Festkörpers **1** war, dürfte die Umsetzung von **1** mit 1-Butyllithium zwar quantitativ erfolgt sein, jedoch scheint die Reaktion von **2** mit *p*-Methoxybenzophenon von einer Reduktion, wie sie auch *Melby & Strobach* [16] festgestellt hatten, begleitet zu sein. Nach Behandlung von **3** mit Acetylchlorid in siedendem Benzol resultierte das Polymere **4**, dessen Chlorgehalt zwischen 915 und 940 μmol pro Gramm **4** schwankte. Zur Bestimmung der tatsächlich umsetzbaren Monomethoxytritylchloride am polymeren Träger wurde das Chlorid **4** einer Methanolyse unterzogen, worauf ein totaler Methoxylgehalt von 1790 μmol pro Gramm **4** festgestellt wurde. Die Differenz der Methoxylwerte des Produkts **4**, das einer Methanolyse unterzogen wurde, und des Polymeren **4** in Chloridform ergab somit einen Gehalt von 750 μmol funktionelle Gruppen pro Gramm. Der zu hohe Chlorgehalt von **4** im Vergleich zum Methoxyl-Differenzwert lässt sich nur durch Einschluss von Acetylchlorid im polymeren Träger erklären, da man kaum annehmen kann, dass bei der Synthese von **4** die ätherische Bindung gespalten wird. Für die Beladungsversuche wurde daher mit einem Gehalt von 750 μmol funktionelle Gruppen pro Gramm des Polymeren **4** gerechnet. Das IR.-Spektrum von **4** entsprach dem von **3**, wobei jedoch die HO-Schwingung bei 3550 cm^{-1} fehlte.

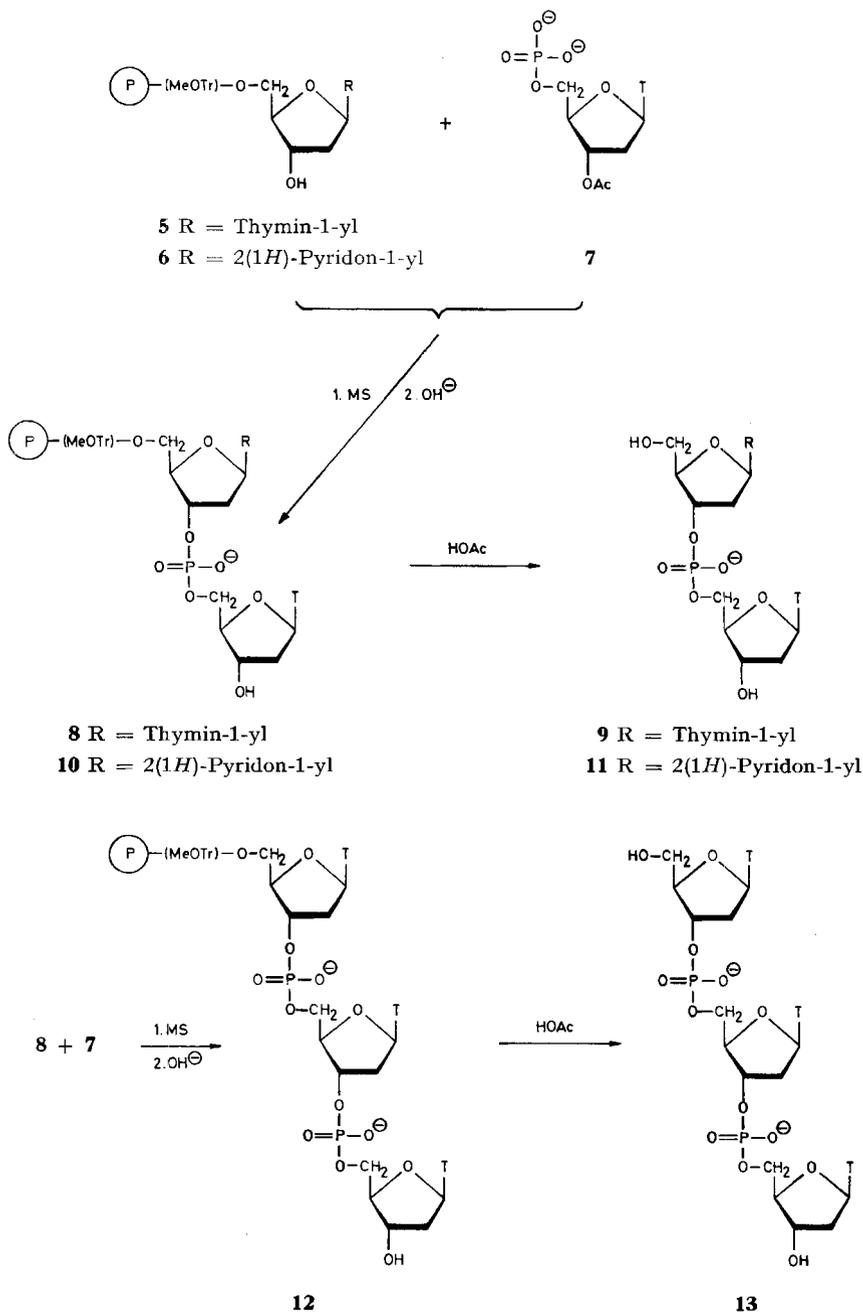
⁴⁾ (P) = makroporöses vernetztes Polystyrol.

Die Einführung einer Monomethoxytritylgruppe mittels einer *Friedel-Crafts*-Reaktion mit Benzoylchlorid und einer anschliessenden *Grignard*-Reaktion mit *p*-Bromanisol, wie sie von *Cramer* [10] beschrieben wurde, gelang weder auf einem «Popcorn»-Polystyrolträger [17], noch auf einem mit 6% Divinylbenzol vernetzten Polystyrol (vgl. exp. Teil).

3. Synthese der Oligodesoxyribonucleotide. – Die Beladung des Trägers **4** mit den Nucleosiden Thymidin und 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon (II_d)⁵⁾ [18] wurde in wasserfreiem Pyridin bei Raumtemperatur während 48 Std. vorgenommen, wobei jeweils ein zweifacher Überschuss an Nucleosid (bezogen auf festkörper-gebundene funktionelle Gruppen) eingesetzt wurde. Durch Zugabe von Methanol liessen sich die nicht umgesetzten Monomethoxytritylchlorid-Gruppen in die entsprechenden Methyläther überführen. Der beladene polymere Träger setzte nach Stehen mit 50proz. wässrigem Pyridin während zwei Tagen bei 70° kein nucleosidisches Material frei, was die kovalente Bindung zwischen der Schutzgruppe und der Zuckereinheit bestätigte. Die Stickstoffwerte der mit Nucleosid beladenen Festkörper liessen auf eine Beladung von 465 μ mol Thymidin resp. eine solche von 650 μ mol II_d pro Gramm Trägermaterial schliessen. Thymidin konnte mit 80proz. wässriger Essigsäure innerhalb 2 Tagen bei 70° bis zu 95% abgelöst werden; unter gleichen Bedingungen wurde II_d jedoch vollständig zerstört. Als sehr gutes Reagens für die Ablösung von Nucleosiden vom Träger erwies sich auch 0,14*N* HCl in trockenem Benzol. Die Abspaltung des Thymidins erfolgte innert 30 Min. quantitativ, diejenige von II_d innert einer Stunde zu 93%. Nucleotide liessen sich jedoch auch bei längerer Reaktionsdauer nur bis zu 40% ablösen. Am günstigsten für die Abspaltung der Pyridon-Nucleoside und -Nucleotide erwies sich das Gemisch Essigsäure/Pyridin 8:2 vom pH = 4,4. Die Spaltung erfolgte allerdings nicht quantitativ. Nucleoside konnten zwar stets zu 90–95%, Nucleotide jedoch nur zu 60–80% abgelöst werden. Zur Ermittlung der vom jeweils verwendeten Träger ablösbaren Nucleosidmenge, die die Grundlage für die Berechnung der Mol-Verhältnisse für die anschliessenden Kondensationsreaktionen bildete, wurde als Ablösungsreagenz 0,14*N* HCl in trockenem Benzol verwendet. Der II_d -Gehalt variierte zwischen 540 und 600 μ mol und der Thymidin-Gehalt zwischen 430 und 460 μ mol pro Gramm mit Nucleosid beladenem Träger.

Die internucleotidischen Bindungen zur Bildung der Oligonucleotide wurden analog zu *Khorana* [19] und *Blackburn* [20] geknüpft, indem der mit dem Nucleosid beladene Träger **5** resp. **6** in wasserfreiem Pyridin mit einem 3fachen Überschuss des Pyridiniumsalzes von 3'-O-Acetyl-thymidin-5'-phosphat (**7**, pT_d(Ac)) [21] und einem 6fachen Überschuss an Mesitylensulfonylchlorid (MS) während 28 Std. bei 23° unter Lichtausschluss behandelt wurde (siehe Schema 2). Nach Entfernen der überschüssigen Reagenzien (vgl. exp. Teil) wurden die Produkte mit 25proz. wässrigem Ammoniak entacetyliert. Die Abspaltung vom Träger erfolgte bei **8** mit 80proz. wässriger Essigsäure, bei **10** mit Essigsäure/Pyridin 8:2 während 48 Std. bei 70°. Das abgelöste nucleotidische Material wurde auf einer DEAE-Cellulose-Säule resp. DEAE-Sephadex-Säule mit einem linearen Ammoniumhydrogencarbonat-Gradienten von 0–0,2*M* eluiert. Dabei wurde auch Thymidin-5'-phosphat gefunden, was zeigt, dass trotz intensivem Waschen der polymeren Träger eine beträchtliche Menge an Reagenz

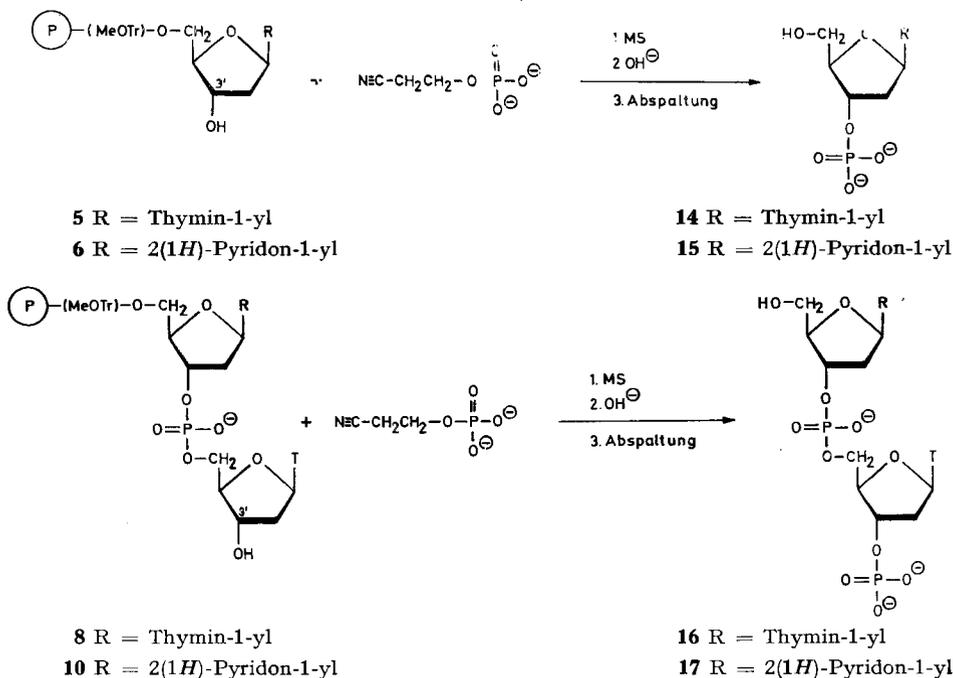
⁵⁾ Wir danken Herrn *W. Zürcher* für die Überlassung von II_d .

Schema 2⁶⁾

⁶⁾ Abkürzungen: MeOTr = *p*-Methoxytrityl; T = Thymin-1-yl.

eingeschlossen worden war. Die Verwendung eines festen Trägers hat dies offenbar nicht verhindern können. Die isolierten Dinucleosid-monophosphate T_d-T_d (**9**) und II_d-T_d (**11**) wurden mit Phosphodiesterase inkubiert. Mit Schlangengift-Phosphodiesterase wurden **9** und **11** vollständig in die entsprechenden Nucleosid-5'-phosphate und Nucleoside gespalten. Ebenso konnte mit Milz-Phosphodiesterase eine 100proz. Spaltung der Produkte in die entsprechenden Nucleosid-3'-phosphate und Nucleoside festgestellt werden. Diese Enzymversuche zeigen, dass in den neuen Produkten ausschliesslich 3'-5'-Phosphodiesterbindungen vorliegen, und dass die Bindung des Start-Nucleosids mit dem polymeren Träger **4** über die 5'-Hydroxylgruppe erfolgt ist.

Die Angabe von Ausbeuten ist schwierig, da mit keinem Ablösungsreagenz in Anwesenheit von Nucleotiden auf dem Festkörper eine 100proz. Abspaltung erzielt werden konnte. Bezieht man die Ausbeute auf die Resultate der Stickstoffbestimmung von **5** resp. **6**, so ist eine Aussage schwierig, da erfahrungsgemäss die Nucleoside, also nicht umgesetztes Ausgangsmaterial, besser abgelöst werden als die Nucleotide. Ausbeuteangaben, die sich auf die Gewichtszunahme der Träger stützen, wären ideal, sofern jeglicher Polymerverlust beim Reinigen und Reagenzeinschlüsse verhindert werden könnten. Um dennoch die Ausbeuten der einzelnen Kondensationschritte miteinander vergleichen zu können, wählten wir das total abgelöste nucleotidische Material ohne Einschlüsse (wie das oben erwähnte Thymidin-5'-phosphat) als Bezugsgrösse. Nach diesem Verfahren liessen sich Ausbeuten von 73% T_d-T_d (**9**) und 49% II_d-T_d (**11**) errechnen. Das von den Festkörpern **8** und **10** abgelöste Material entsprach ca. 80% der ursprünglich an den polymeren Trägern **5** und **6** gebundenen Nucleosidmengen.

 Schema 3⁶⁾


Das Trithymidin-diphosphat ($T_d-T_d-T_d$) (**13**) wurde in analoger Weise hergestellt. Die vom Träger abgelösten Produkte wurden auf einer DEAE-Cellulose-Säule mit einem linearen Ammoniumhydrogencarbonat-Gradienten von 0–0,25M eluiert, wobei 39% auf nicht umgesetztes Thymidin, 21% auf T_d-T_d (**9**) und 40% auf das erwünschte $T_d-T_d-T_d$ (**13**) entfielen. Aus diesen Werten lässt sich für die Kondensation von **8** mit **7** zu **13** eine Ausbeute von 66% errechnen, ein für die Festphasensynthese überdurchschnittlich hoher Wert. Neben den erwähnten Produkten wurde, wie auch bei den übrigen Versuchen, stets eine kleine Menge Thymidin-5'-phosphat gefunden.

Terminale Phosphorylierungen von Nucleosiden, die an einen Träger gebunden sind, sind von *Letsinger* [5] eingehend untersucht worden. Als Phosphatkomponente

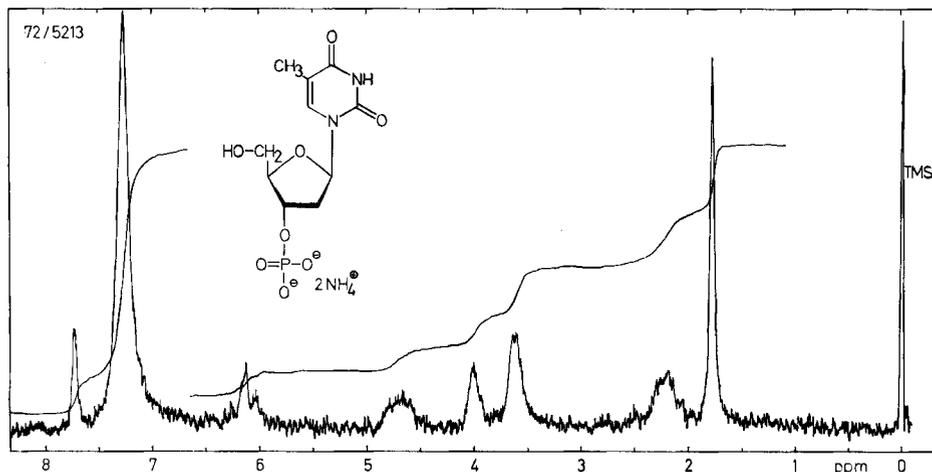


Fig. 1. 60-MHz-NMR.-Spektrum von Tdp (**14**) in $(CD_3)_2SO^7)$

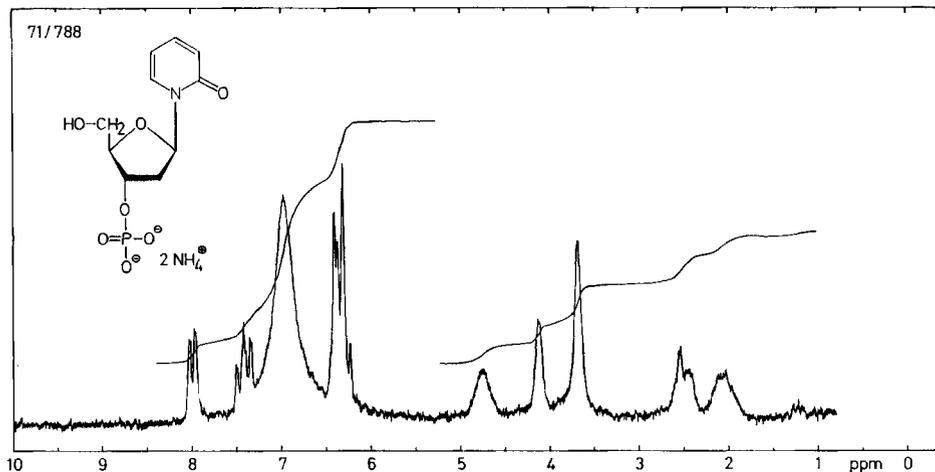


Fig. 2. 100-MHz-NMR.-Spektrum von $IIdp$ (**15**) in $(CD_3)_2SO^7)$

⁷⁾ Die chemischen Verschiebungen in den NMR.-Spektren sind δ -Werte mit $\delta = 0$ für Tetramethylsilan.

wurde β -Cyanoäthylphosphat, als Kondensationsmittel MS oder Dicyclohexyl-carbodiimid (DCCI) verwendet. Thymidin, dessen 3'-Hydroxylgruppe mit der Carboxylgruppe des Trägers verestert war, wurde so in 5'-Stellung phosphoryliert.

Wir haben die 3'-Phosphorylierung der Produkte **5** und **6** resp. **8** und **10** untersucht (vgl. Schema 3). Dabei erwies sich MS, im Gegensatz zu den Beobachtungen von *Letsinger* [5], der mit Dicyclohexyl-carbodiimid die besseren Ausbeuten erhielt, als wirksameres Kondensationsmittel. Versuche mit DCCI lieferten nämlich nur 60% Ausbeute an Thymidin-3'-phosphat trotz einer Reaktionsdauer von 7 Tagen, wogegen mit MS die Reaktionszeit auf 5 Std. verkürzt werden konnte und die Ausbeute an Thymidin-3'-phosphat (**14**) 75% betrug. Für die Phosphorylierung der an Träger gebundenen Nucleoside wurde jeweils ein 5facher Überschuss an Pyridinium- β -cyanoäthylphosphat und ein 15facher Überschuss an MS verwendet. Die vom polymeren Träger abgelösten Produkte wurden auf einer DEAE-Sephadex-Säule mit einem linearen Ammoniumhydrogencarbonat-Gradienten getrennt. Die isolierten Produkte waren im Dünnschichtchromatogramm und in der Elektrophorese einheitlich. Die 3'-Phosphorylierung von II_d (**6**) zu (**15**) erfolgte in einer Ausbeute von 51% (**14** wurde zu 75% erhalten). Auf Grund der Chromatogramme war es allerdings nicht sicher, ob die Reaktion tatsächlich in 3'-Stellung stattgefunden hatte. Hingegen bestätigten die NMR.-Spektren von **14** (Fig. 1) und **15** (Fig. 2) die Struktur dieser Verbindungen. Die Signale der beiden Protonen an C(5'), die bei einem 5'-Nucleotid bei $\delta = 4,0$ ppm [18] erscheinen, treten bei 3,68 ppm auf.

Als weiteren Strukturbeweis von **14** und **15** wurden die Nucleotide mit «rohem» Schlangengift von *Crotalus adamanteus*, das neben vielen anderen Enzymen eine stark aktive 5'-Nucleotidase [22] (EC 3.1.3.5) enthält, inkubiert. Beide Produkte waren während 3 Std. resistent, während ein entsprechendes 5'-Nucleotid schon nach 1 Std. vollständig gespalten worden war. Damit ist auch auf diesem Wege die 3'-Stellung des Phosphatrests bewiesen.

Bei diesen Phosphorylierungsversuchen trat jeweils in geringen Mengen ein unerwartetes Dinucleosid-monophosphat auf. Seine dünnschichtchromatographischen und elektrophoretischen Eigenschaften entsprachen zwar einem normal verknüpften 3'-5'-Dinucleosid-monophosphat, es liess sich aber weder durch Milz- noch durch Schlangengift-Phosphodiesterase spalten. Wir vermuten darum, dass es sich bei diesem Produkt um ein 3'-3'-Dinucleosid-monophosphat handelt, wie es auch *Letsinger* [23] bei der Anwendung der Phosphodiester-Methode in Lösung gefunden hatte. Bei diesem Verfahren wird Tritylthymidin mit β -Cyanoäthylphosphat und Triisopropylbenzolsulfonylchlorid in 3'-Stellung phosphoryliert. Der so gebildete Phosphodiester vermag nun weitgehend selektiv die 5'-Hydroxylgruppe eines ungeschützten Thymidins in einem weiteren Phosphorylierungsschritt zu erfassen. 96% des gebildeten T_d - T_d weisen die natürliche 3'-5'-Phosphodiesterbindung auf, während 4% eine 3'-3'-Bindung besitzen. Unser Phosphorylierungsverfahren ist im ersten Schritt mit dem von *Letsinger* identisch, jedoch scheint bei uns gleichzeitig, wahrscheinlich infolge der äusserst günstigen Lage einer freien 3'-Hydroxylgruppe, eine zusätzliche Triesterbildung aufzutreten, die zu dem 3'-3'-Dinucleosid-monophosphat führt.

Die Phosphorylierungen der Produkte **8** und **10** wurden in analoger Weise mit β -Cyanoäthylphosphat und MS als Kondensationsmittel durchgeführt. So konnte T_d - T_d zu 69% in **16**, II_d - T_d jedoch nur zu 47% in **17** übergeführt werden. Die gerin-

gere Ausbeute an II_a -T_{ap} (17) steht im Einklang mit der ebenfalls geringeren Ausbeute an II_{ap} (15), wobei vermutet wird, dass die Base 2(1*H*)-Pyridon mit den Phosphorylierungsreagenzien eine unerwünschte Nebenreaktion eingeht (vgl. auch [18]). Ein entsprechendes Nebenprodukt konnte allerdings nie festgestellt werden. Die enzymatischen Spaltungen mit Schlangengift-Phosphodiesterase führten sowohl bei 16 wie auch bei 17 zu keiner Spaltung. Milz-Phosphodiesterase spaltete jedoch beide Produkte in die entsprechenden Nucleosid-3'-phosphate, die elektrophoretisch nachgewiesen wurden. Ein dem 3'-3'-Dinucleosid-monophosphat entsprechendes falsch verknüpftes Tetranucleotid konnte nicht gefunden werden.

4. Diskussion. – Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen einmal mehr, dass die Ausbeuten bei der Festphasensynthese von Oligonucleotiden weit unter denen der Synthese in Lösung liegen. Dies kann einerseits auf sterische Gründe zurückgeführt werden, andererseits aber auch mit den mangelnden Kenntnissen über die Reaktionsmechanismen bei der Kondensation in Zusammenhang gebracht werden. Ein entscheidender Durchbruch zu einem verbesserten Verfahren konnte trotz der Verwendung eines makroporösen, starren Trägers nicht erzielt werden. Die Vorteile der Festphasenmethode scheinen uns zur Zeit noch in der guten Handlichkeit der auf den Trägern gebundenen Produkte und der Leichtigkeit, mit der sie zu reinigen sind, begründet zu sein.

Wir danken dem «Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung» (Projekte Nr. 2.48.68 und 2.460.71) für die finanzielle Unterstützung dieser Untersuchung.

Experimenteller Teil

1. Allgemeines. – *Spektren und Diagramme* wurden auf folgenden Geräten aufgenommen: UV.-Elutionsdiagramme bei 254 nm mit dem «Uvicord» Typ LKB 4701A, UV.-Spektren mit einem Beckman-UV.-Spektrophotometer, Modell DK 2, IR.-Spektren mit einem Perkin-Elmer-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125, 60-MHz-NMR.-Spektren mit einem Varian-A-60-Spektrometer. Diese Spektren wurden im Spektrollaboratorium des Instituts (K. Aegerter) gemessen. Die 100-MHz-NMR.-Spektren wurden mit einem Varian-HA-100-D-Spektrometer im Institut für physikalische Chemie (E. Jutz) gemessen. Abkürzungen: *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *m* = Multipllett, *br* = breit. – Die optischen Drehungen wurden mit einem Perkin-Elmer-Polarimeter, Modell 141, gemessen. – Proben zur Elementaranalyse wurden bei 80° und 0,02 Torr 14 Std. getrocknet. Die Analysen verdanken wir dem mikroanalytischen Labor des Instituts (E. Thommen) und der Sandoz A.G., Basel.

Für die Ionenaustauscher-Chromatographie wurde Cellulose von Serva, Heidelberg, Typ DEAE-SS, und DEAE-Sephadex-A25 von Pharmacia, Uppsala, verwendet. Zur analytischen Papierchromatographie diente Whatman No. 1, bei der präparativen Papierchromatographie Whatman No. 3. Die Dünnschichtchromatographie (DC.) erfolgte auf Fertigplatten der Firma E. Merck A.G., Kieselgel F₂₅₄, Schichtdicke 0,25. Die Flecke wurden im UV.-Licht oder durch Besprühen mit 10proz. Perchlorsäure und anschliessendes Erhitzen auf 150–200° sichtbar gemacht. Fließmittel: A: Methylenchlorid/Methanol 9:1 (*v/v*); B: 2-Propanol/konz. NH₃/H₂O 7:1:2 (*v/v*); C: 1-Butanol/Eisessig/H₂O 5:2:3 (*v/v*); D: Essigsäure-äthylester/Aceton/H₂O 7:4:1 (*v/v*).

Die Papierelektrophorese wurde in einer wassergekühlten Apparatur (vgl. [24]) durchgeführt. Puffersysteme: für pH 3,5: 0,05M Acetat-Puffer; für pH 7,5: 0,05M Phosphat-Puffer. Das Spannungsgefälle betrug 18–20 V/cm. Papier: Whatman No. 1.

Substanzen. Das verwendete Pyridin (Fluka A.G., Buchs) wurde über Molekularsieb 4 Å (Union Carbide) mindestens 4 Wochen aufbewahrt. Die Substanzen für die Reaktionen wurden durch mehrfaches Abdampfen mit absolutem Pyridin, zuletzt im Hochvakuum, getrocknet. Die polymeren Träger wurden jeweils bei 60° und 0,05 Torr 2 Tage getrocknet. Ammoniumhydrogen-

carbonat (Typ AnalaR, BDH, England) wurde durch mehrfaches Eindampfen mit Methanol/H₂O 9:1 (*v/v*) entfernt. Die isolierten Nucleotide wurden in Form ihrer Ammoniumsalze lyophilisiert und 24 Std. bei 60° und 0,03 Torr getrocknet.

Enzymversuche mit «rohem» Schlangengift von *Crotalus adamanteus* (F. G. Celso, D-6660 Zweibrücken) wurden nach Séquin & Tamm [18] durchgeführt. Die Spaltungen mit Milz-Phosphodiesterase (von Nutritional Biochemicals Corporation) und mit Schlangengift-Phosphodiesterase (Russel's Viper, B-Grade, Calbiochem) wurden nach Falk & Tamm [1] durchgeführt.

2. Makroporöses, mit 5,6 Mol-% Divinylbenzol vernetztes Brom-Styrol/Styrol Copolymeres (1). – In einem 2,5-l-Sulfierkolben, der mit einem Rührer (1350 Umdrehungen/Min.), einem Thermometer, einem 500-ml-Tropftrichter mit Druckausgleich und einer Stickstoff-Ein- und -Ausleitung versehen war, wurden 1,5 l abgekochtes, destilliertes Wasser bei 45° mit 15 g Polyvinylalkohol versetzt. Eine homogene Mischung von 83,2 g (0,8 mol) Styrol, 40 g *p*-Bromstyrol (Fluka A.G., Buchs, Gehalt 92,5 Gewicht-% – dies entspricht 36,8 g resp. 0,2 mol), 14,2 g technischem Divinylbenzol (Schuchardt, München, Gehalt 55 Gewicht-% Isomergemisch – dies entspricht somit 7,8 g resp. 0,06 mol Divinylbenzol), 1,2 g (0,005 mol) Dibenzoylperoxid und 138 g (1 mol) Decalin wurde während 1 Std. unter starkem Rühren so zugetropfelt, dass die Mischung sich in Wasser als kleine Tröpfchen verteilen konnte. Nach 5 Std. wurde die Reaktionstemperatur auf 80–83° erhöht und während 64 Std. bei konstanter Rührgeschwindigkeit beibehalten. Nach weiterem Rühren des abgekühlten Reaktionsgemischs während eines Tages bei Raumtemperatur, wurde das gebildete Perlpolymerisat **1** abfiltriert und je 3mal mit 1 l Wasser, 1 l Methanol und 1 l Benzol sowie einmal mit 1 l siedendem Benzol während 5 Std. gewaschen. Das farblose Perlpolymere wurde bei 0,05 Torr und 85–90° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Siebanalyse ergab 94,0 g (74%) Copolymer **1** mit einem Perlendurchmesser von 0,06–0,6 mm. Bromgehalt von **1**: Ber. 12,5, Gef. 12,4%.

3. Der Aufbau der Monomethoxytritylgruppe am Träger. – 3.1. *Synthese des Trägers 4* via *Lithium-Derivat* von **1**. Die Synthese wurde nach Melby & Strobach [16] in modifizierter Form durchgeführt, indem in einem mit Stickstoff gespülten 2,5-l-Sulfierkolben, der mit einem Rührer und Kühler ausgerüstet war, eine nach Gilman [25] hergestellte 0,5M ätherische Lösung von 1-Butyllithium mit 1,5 l über Natrium getrocknetem Benzol versetzt wurde. In die leicht trübe Lösung wurden 90 g **1** (entspricht 0,141 mol Brom) in Portionen zu je 10 g eingebracht. Nach 24 Std. Rühren bei Raumtemperatur liess man das *Produkt 2* absetzen und entfernte die überstehende Lösung mittels eines Stickstoff-Überdrucks durch ein Glasrohr, das am Ende mit einem Stück Glaswolle versehen war. Nachdem das polymere Material **2** 6mal mit 500 ml Benzol unter Stickstoff-Atmosphäre gewaschen worden war, reagierte die letzte Waschfraktion nach der Hydrolyse neutral.

1,5 l über Natrium getrocknetes Benzol wurde zu **2** zugegeben und anschliessend mit 32 g (0,15 mol) *p*-Methoxybenzophenon in 3 Portionen bei Raumtemperatur versetzt. Nach 24 Std. wurden 400 ml Lösung abgesaugt und eine Mischung von 50 ml konz. HCl, 50 ml H₂O und 400 ml Eisessig beigelegt. Eine Minute nach der Zugabe hellte das gelbe Polymer auf und war nach zwei Minuten orange-rot. Nach 15 Std. wurde das hellrote Produkt abfiltriert und 4mal mit 1 l Wasser, 2mal mit 500 ml 2N Sodalösung und mit Wasser bis zur Neutralität der Waschflüssigkeit gewaschen. Zur besseren Trocknung wurde der *Träger 3* mit 1 l Aceton gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz bei 80° und 0,05 Torr getrocknet. – Das IR.-Spektrum (fest in KBr) von **3** zeigte neben den bekannten Polystyrol-Absorptionsbanden folgende neue Banden: 3550, 3420 cm⁻¹ (stammt von Polyvinylalkohol-Einschlüssen), 1240, 1069 und 1000 cm⁻¹. Brombestimmung: Gef. 0%; Methoxylbestimmung: Gef. 3,23%, entspricht 1,04 mmol funktionelle Gruppen pro 1 g polymerer *Träger 3*.

Um das *Chlorid 4* zu erhalten, wurden in einem 750-ml-Sulfierkolben, der mit einem Rührer und Intensivkühler ausgerüstet war, 30 g **3** (31,2 mmol Tritylalkohol) in 400 ml trockenem Benzol bei 80° mit 90 ml (1280 mmol) Acetylchlorid versetzt. Nach 12 Std. wurde das hellbraune *Produkt 4* unter Ausschluss von Feuchtigkeit abfiltriert und mit 1 l Benzol bei 80° 1 Tag lang von überschüssigem Acetylchlorid befreit und anschliessend bei 80° und 0,05 Torr getrocknet. – Das IR.-Spektrum (fest in KBr) von **4** entsprach dem von **3**, wobei jedoch die Bande bei 3550 cm⁻¹ fehlte. Chlorbestimmung: 10 mg **4** wurden mit 5 ml 0,01N NaOH und 5 ml Äthanol versetzt.

Rücktitration nach 3 bzw. 6 Tagen mit 0,01 N AgNO_3 -Lösung. Die Werte der Proben schwankten von 3,20 bis 3,32% Chlor, was einem Chlorgehalt von 915–940 μmol pro 1 g **4** entsprach. Zur Bestimmung der tatsächlich umsetzbaren Chloride wurde das Polymere **4** während 2 Tagen mit abs. Methanol stehengelassen. Die Methoxylbestimmung ergab jetzt einen Wert von 5,55%, was einem Methoxylgehalt von 1,79 mmol pro 1 g **4** entspricht. Aus der Differenz des Methoxylgehalts von **3** und demjenigen des Methanolyseproduktes von **4** errechnete sich der Gehalt des Festkörpers **4** an umsetzbarem Chlorid zu 750 μmol pro Gramm Festkörper.

3.2. *Versuche zur Synthese von 4 via Acylierung und Grignard-Reaktion.* 5,2 g Perlpolymer, hergestellt nach 2. (entspricht ca. 50 mmol Phenylresten) und 6 g resp. 35 mmol Anisoylchlorid wurden bei Raumtemperatur mit 250 ml Nitrobenzol versetzt. 5 g (38 mmol) AlCl_3 wurden in kleinen Portionen während 45 Min. zugegeben. Die Farbe des Trägers wechselte von hellgelb nach orange. Die Suspension wurde nach Zugabe der letzten Portion AlCl_3 6 Std. bei 70° gehalten. Nach Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch mit 450 ml Eis/Wasser-Gemisch versetzt und nach 1 Std. vom Festkörper abfiltriert, der letztere wie üblich gewaschen und bei 80° und 0,05 Torr getrocknet. Das IR.-Spektrum (in KBr) des acylierten polymeren Trägers zeigte eine C=O-Schwingung bei 1660 cm^{-1} , sowie die Arylätherschwingung bei 1255 cm^{-1} . Nach Versetzen des acylierten Produkts in einem 250-ml-Widmer-Kolben mit 100 ml trockenem Benzol wurde eine ätherische Lösung von 12 g (66 mmol) Phenylmagnesiumbromid zugegeben und das Reaktionsgemisch während 2 Tagen auf 70° gehalten. Die Lösung reagierte stets positiv mit *Michlers* Keton [26]. Nach Abkühlen wurde das polymere Trägermaterial abfiltriert, mit 70 ml 2N HCl versetzt und wie üblich gereinigt. Die Probe auf Monomethoxytritylalkohol mit 60proz. Perchlorsäure in Wasser [6] fiel negativ aus. Ebenso zeigte das IR.-Spektrum (in KBr) keine Hydroxybande bei 3550 cm^{-1} .

Diese Befunde zeigen eindeutig, dass auf diesem Weg keine Monomethoxytritylgruppe auf dem Träger synthetisiert werden kann.

4. *Beladungsversuche.* - 4.1. *Polymeres 5 aus 4.* 1 g **4** (750 μmol umsetzbare Chloride) wurde in 45 ml trockenem Pyridin mit 365 mg (1500 μmol) Thymidin bei 23° 3 Tage lang geschüttelt. Der hellgelbe, beladene Träger **5** wurde abfiltriert und mit 500 ml Wasser und 500 ml Äthanol gewaschen. Zur Bestätigung der covalenten Ätherbindung zwischen Thymidin und dem Träger wurde **5** mit 50proz. wässrigem Pyridin 2 Tage bei 70° behandelt. Die vom Festkörper abfiltrierte Lösung wurde so lange im Rotationsverdampfer mit Wasser eingedampft, bis kein Pyridin mehr feststellbar war. Die wässrige, pyridinfreie Lösung enthielt nach dem UV.-Spektrum kein nucleosidisches Material. Es waren somit auch keine Nucleosid-Einschlüsse im Träger vorhanden. Nach 2maliger Behandlung mit je 250 ml Äthanol wurde **5** bei 80° und 0,05 Torr getrocknet. Gef. N 1,3%, entspr. einer Beladung von 465 μmol Thymidin pro 1 g Träger.

4.2. *Polymeres 6 aus 4.* Die Reaktion von 1 g **4** (750 μmol Chlorid auf dem Träger) mit 320 mg (1517 μmol) II_a wurde, wie auch die Aufarbeitung, in ähnlicher Weise wie unter 4.1. beschrieben durchgeführt. Gef. N 0,91%, entspr. einer Beladung von 650 μmol II_a pro 1 g Träger.

5. *Abspaltung der Nucleoside von den Polymeren 5 resp. 6.* - 5.1. *Mit 80proz. wässriger Essigsäure.* Die Ablösung der Nucleoside vom Trägermaterial als Funktion der Zeit wurde mit Proben von je 20 mg **5** resp. **6** in 10 ml 80proz. wässriger Essigsäure bei 70° untersucht. Aliquote der flüssigen Phase wurden von Zeit zu Zeit dem Reaktionsgefäß entnommen und im Rotationsverdampfer 3mal mit 10 ml Wasser eingedampft. Durch Messen der optischen Dichte wurde die abgelöste Nucleosidmenge bestimmt.

Mit diesem Ablösungsreagenz wurden aus **5** nach 1 Std. 29%, nach 6 Std. 70%, nach 24 Std. 93% und nach 2 Tagen 95% Thymidin abgelöst. Diese Werte wurden auf Grund der aus der Stickstoffanalyse von **5** berechneten Thymidinbeladung erhalten. Das isolierte Produkt war dünnschichtchromatographisch im System D einheitlich und identisch mit einer authentischen Probe.

Das *Ablösungsprodukt* von **6** nach 1 Std. Reaktionsdauer zeigte im Dünnschichtchromatogramm im System A kein II_a , sondern Zersetzungsprodukte mit den Rf-Werten 0,25 (Pyridon) und 0,10, sowie einen schwachen Startfleck, der nicht UV.-aktiv war, sich jedoch beim Besprühen mit HClO_4 -Lösung und Erhitzen braun färbte.

5.2. *Mit 0,14N HCl in Benzol.* Je 15 mg **5** resp. **6** wurden in einem verschlossenen Reagenzglas mit 5 ml 0,14N HCl in trockenem Benzol versetzt und nach verschiedenen Reaktionsdauern ab-

filtriert, wobei das Filtrat in 7 ml 25proz. Ammoniaklösung eingetroppt wurde. Das basische Filtrat wurde 3mal mit 10 ml Wasser eingedampft. Durch Messen der optischen Dichte wurde der Nucleosidgehalt bestimmt. Folgende Nucleosidablösungsraten wurden festgestellt:

Thymidin vom Träger **5**: 83% nach 5 Min., 91% nach 15 Min., 100% nach 30 Min.

Π_d vom Träger **6**: 70% nach 5 Min., 92% nach 30 Min., 93% nach 1 Std., 93% nach 3 Std.

Die isolierten Nucleoside waren in dem bei 5.1. verwendeten System DC.-einheitlich und identisch mit authentischen Proben.

5.3. *Mit Eisessig/Pyridin 8:2 (v/v)*. Die Versuche wurden in analoger Weise zu 5.1. durchgeführt, wobei jedoch als Ablösungsreagenz Eisessig/Pyridin 8:2 (*v/v*) mit einem pH von 4,4 verwendet wurde.

Von **5** konnte 95% Thymidin, von **6** 96% Π_d nach 48stdg. Rühren bei 70° abgelöst werden. Beide Produkte waren DC.-einheitlich und identisch mit authentischen Proben.

6. Synthese von T_d - T_d (9) und Π_d - T_d (11). – 6.1. T_d - T_d (9) aus **5**. 440 mg (0,2 mmol gebundenes Thymidin) **5** wurden mit einer Lösung von 265 mg (0,6 mmol) 3'-O-Acetyl-thymidin-5'-phosphat (**7**, Pyridiniumsalz, $pT_d(AC)$, [21]) und 260 mg (1,2 mmol) MS (*Aldrich-Europe*) in 6 ml Pyridin versetzt. Nach 28 Std. bei Raumtemperatur wurde das braune Produkt **8** abfiltriert und mit 250 ml Pyridin/Wasser 1:1 (*v/v*) gewaschen. Zur Entfernung von Reagenzeinschlüssen wurde **8** mit 50 ml Pyridin/Wasser 8:2 (*v/v*) während 5 Std. bei 70° behandelt, anschliessend abfiltriert und mit 500 ml 95proz. Äthanol gewaschen. Die Abspaltung der gebildeten Produkte von **8** wurde während 2 Tagen bei 70–75° in 50 ml 80proz. wässriger Essigsäure durchgeführt. Die Ablösungsprodukte wurden nach dem Abfiltrieren der polymeren Träger im Rotationsverdampfer 3mal mit 15 ml Wasser eingedampft. Zur Entacetylierung wurde über Nacht bei 23° mit 30 ml 25proz. Ammoniaklösung stehengelassen. Die eingedampften Produkte wurden auf Ionenaustauschersäulen getrennt.

DEAE-Cellulose-Säule (55 × 4 cm, Hydrogencarbonat-Form). Elutionsgradient: Mischgefäss: 2 l 0,01 M NH_4HCO_3 in Wasser, Vorratsgefäss: 2 l 0,2 M NH_4HCO_3 in Wasser; Fraktionengrösse: 25 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,65 ml/Min. Die Substanzen wurden in 20 ml 0,01 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung auf die Säule aufgetragen.

Fraktionen	Gradient M NH_4HCO_3	OD ₂₆₄ ⁸⁾	μ mol ⁹⁾	%	Substanz
24–31	0,040–0,049	437	45	27	T_d
53–61	0,086–0,096	2268	122	73	T_d - T_d (9)
85–94	0,139–0,150	116			pT_d

Das gleiche Produkteverhältnis konnte auch mit einer DEAE-Sephadex-Säule (60 × 1,5 cm, Hydrogencarbonat-Form) erzielt werden. Die Produkte wurden in 10 ml Wasser auf die Säule aufgetragen. Elutionsgradient: Mischgefäss: 2 l Wasser, Vorratsgefäss: 2 l 0,2 M NH_4HCO_3 in Wasser; Fraktionengrösse: 25 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktionen	Gradient M NH_4HCO_3	Substanz
1–5	0 – 0,01	T_d
25–36	0,030–0,044	T_d - T_d (9)
74–88	0,084–0,105	pT_d

Vom total abgelösten nucleotidischen Material entfielen 73% auf T_d - T_d (9), welches im Dünnschichtchromatogramm in den Systemen B und C mit den Rf-Werten 0,48 und 0,50 einheitlich und identisch mit einer authentischen Probe war.

⁸⁾ Die Anzahl der «Optical-Density»-Einheiten (OD.) ist das Produkt aus dem totalen Volumen der Lösung in ml und ihrer optischen Dichte, gemessen in einer 1-cm-Zelle bei der angegebenen Wellenlänge.

⁹⁾ Berechnet auf Grund der ϵ -Werte von *Khorana* [21].

Analog zu einem von *Khorana* [6] beschriebenen Versuch wurden 20 mg **5** (10 μmol trägergebundenes Thymidin), 80 mg (180 μmol) Pyridinium-pT_d(Ac) und 77 mg (360 μmol) MS in 10 ml Pyridin zur Reaktion gebracht. Nach 28 Std. wurde der beladene Träger abfiltriert und wie oben beschrieben weiterbehandelt. Die Ausbeute an T_d-T_d betrug jedoch nur 70% ([6]: 97%).

6.2. **II_dT_d (11) aus 6.** 70 mg **6** (42 μmol trägergebundenes II_d) wurden mit einer Lösung von 56 mg (126 μmol) Pyridinium-pT_d(Ac) (**7**) und 55 mg (252 μmol) MS in 6 ml Pyridin versetzt. Die Reaktionsdauer und die Reinigung des *Trägermaterials* **10** entsprachen dem Verfahren von 6.1. Zur Abspaltung der Produkte vom Träger wurde bei 70–75° während 2 Tagen in 60 ml Essigsäure/Pyridin 8:2 (*v/v*) stehengelassen. Nach der Entacetylierung der abgelösten Produkte mit 25proz. Ammoniaklösung über Nacht bei 23° wurde die Lösung 5mal mit 20 ml Wasser im Rotationsverdampfer eingedampft. Die Produkte wurden auf einer DEAE-Cellulose-Säule (2,5 × 27 cm, Hydrogencarbonat-Form) getrennt. Elutionsgradient: Mischgefäss: 2 l Wasser, Vorratsgefäss: 2 l 0,2 M NH₄HCO₃ in Wasser; Fraktionengrösse: 25 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 2,27 ml/Min.

Fraktionen	Gradient M NH ₄ HCO ₃	OD ₃₀₀ ⁸⁾	% OD ₃₀₀	μmol	Substanz
1–10	0 000–0,012	80	51	13,5	II _d
20–30	0,022–0,034	78	49	12,9	II _d -T _d (11)
50–64	0,058–0,072	9 ¹⁰⁾			pT _d

Das Produkteverhältnis war bei der Verwendung einer DEAE-Sephadex-Säule (60 × 1,5 cm, Hydrogencarbonat-Form) gleich. Elutionsgradient: Mischgefäss: 2 l Wasser, Vorratsgefäss: 2 l 0,2 M NH₄HCO₃ in Wasser; Fraktionengrösse: 22,5 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktionen	Gradient M NH ₄ HCO ₃	Substanz
1–8	0 –0,010	II _d
20–32	0,023–0,035	II _d -T _d (11)
66–82	0,070–0,092	pT _d

49% des abgelösten Materials war II_d-T_d (**11**), welches im Dünnschichtchromatogramm in den Systemen B und C mit den R_f-Werten 0,48 und 0,51 einheitlich war.

Die *enzymatischen Abbauversuche*, die mit Milz- und mit Schlangengift-Phosphodiesterase nach [1] durchgeführt wurden, zeigten im Dünnschichtchromatogramm in System B nur noch die entsprechenden Nucleoside und Nucleotide. Das Verhältnis T_d/II_dp bzw. II_d/pT_d betrug nach Papierchromatographie in System B, Elution der Flecke und Bestimmen der optischen Dichte 1:0,97.

UV.-Spektrum von **11** in Wasser: Maxima bei 267, 215 und 200 nm sowie Schulter bei 300 nm.

7. **Synthese von T_d-T_d-T_d (13) aus 8.** – 500 mg **8** (ca. 160 μmol trägergebundenes T_d-T_d) wurden 3mal mit je 100 ml Äthanol gewaschen und 24 Std. bei 0,05 Torr und 80° getrocknet. Eine Lösung von 260 mg (590 μmol) Pyridinium-pT_d(Ac) und 385 mg (1770 μmol) MS in 7 ml

Fraktionen	Gradient M NH ₄ HCO ₃	OD ₂₆₄	μmol	% μmol	Substanz
17–30	0,040–0,052	485	50	39	T _d
58–66	0,104–0,120	522	28	21	T _d -T _d (9)
81–84	0,142–0,150	66			pT _d
90–100	0,160–0,180	1320	51	40	T _d -T _d -T _d (13)

¹⁰⁾ OD₂₆₄

Pyridin wurde zum getrockneten Träger **8** gegeben. Nach 3 Tagen Reaktionsdauer bei 23° wurde das beladene Trägermaterial **12** wie in 6.1. beschrieben gereinigt, entacetyliert und die Produkte vom Träger abgespalten. Die Trennung der Produkte erfolgte auf einer DEAE-Cellulose-Säule (55 × 4 cm, Hydrogencarbonat-Form). Elutionsgradient: Mischgefäss: 2 l Wasser, Vorratsgefäss: 2 l 0,25 M NH₄HCO₃ in Wasser; Fraktionengrösse: 25 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 0,83 ml/Min.

Das isolierte T_d-T_d-T_d (**13**) war im Dünnschichtchromatogramm in System B mit dem Rf-Wert 0,44 einheitlich und identisch mit einer authentischen Probe. Vom abgelösten nucleotidischen Material entfielen 40% auf reines T_d-T_d-T_d. Die Umsetzung von **8** zu **13** ist demnach zu 66% erfolgt.

8. Phosphorylierungsversuche. - *Allgemeines:* Die terminalen Phosphorylierungen der trägergebundenen Nucleoside wurden in Analogie zu den Versuchen von *Letsinger* [5] durchgeführt. Eine Lösung von 1 mmol/ml β-Cyanoäthylphosphorsäure (Pyridiniumsalz) in Pyridin wurde nach [1] hergestellt.

8.1. *T_dp* (**14**) aus **5**. 2,15 g **5** (1 mmol trägergebundenes T_d) wurden mit 5 ml der Stammlösung von β-Cyanoäthylphosphorsäure und mit 3,3 g (15,1 mmol) MS in 5 ml Pyridin bei 23° versetzt. Nach 5 Std. wurde der braune Festkörper abfiltriert und 3mal mit 100 ml Äthanol gewaschen. Zur Entfernung der Phosphorsäure-Schutzgruppe wurde der Träger bei 23° mit 25proz. Ammoniaklösung über Nacht behandelt. Das dunkelgelbe Trägermaterial wurde anschliessend abfiltriert und mit 100 ml Äthanol gewaschen. Zur Abspaltung der Produkte wurde in 200 ml 80proz. wässriger Essigsäure bei 70-75° während 2 Tagen stehengelassen. Die vom Festkörper abgetrennte Lösung wurde im Rotationsverdampfer 3mal mit 20 ml Wasser eingedampft. Der zurückbleibende Lack wurde in 20 ml Wasser gelöst und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (66 × 4 cm, Hydrogencarbonat-Form) aufgetragen. Elutionsgradient: Mischgefäss: 2 l Wasser, Vorratsgefäss: 2 l 0,23 M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 25 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,6 ml/Min.

Fraktionen	Gradient M NH ₄ HCO ₃	OD ₂₆₄	% OD ₂₆₄	Substanz
24-40	0,037-0,068	1900	18	T _d
65-80	0,115-0,145	770	7	
106-125	0,190-0,240	8200	75	T _d p (14)

Das in den Fraktionen 65-80 enthaltene Material zeigte sowohl im Dünnschichtchromatogramm in den Systemen B und C mit den Rf-Werten 0,48 und 0,50 wie auch in der Elektrophorese bei pH 3,5 mit dem Rf(pT_d)-Wert 0,86¹¹⁾ die gleichen chromatographischen Eigenschaften wie das nach 6.1. hergestellte T_d-T_d (**9**). Auch das UV.-Spektrum stimmte mit demjenigen von **9** überein. Das unbekannte Produkt war allerdings weder mit Milz- noch mit Schlangengift-Phosphodiesterase spaltbar. Es handelt sich sehr wahrscheinlich um T_d3'-3' T_d [23].

Die Substanz in den Fraktionen 106-125, T_dp (**14**), war im Dünnschichtchromatogramm in den Systemen B und C mit den Rf-Werten 0,12 und 0,45 einheitlich. In der Elektrophorese verhielt sich T_dp sowohl bei pH 3,5 wie auch bei pH 7,5 gleich wie pT_d. [α]_D²⁴ = +18° ± 2° (c = 1,01 in Wasser). Die Ausbeute an isoliertem T_dp (**14**) betrug 75%.

Charakterisierung des NH₄-Salzes von T_dp (**14**): UV.-Spektrum in Wasser: Maxima bei 264 und 207 nm. 60-MHz-NMR.-Spektrum in (CD₃)₂SO¹²⁾ (vgl. Fig. 1): s bei 7,72 ppm, 1H an C(6); br s bei 7,26 ppm, 8H* der NH₄⁺-Ionen und OH* an C(5'); t bei 6,13 ppm, 1H an C(1'), J = 6 Hz; m bei 4,70 ppm, 1H an C(3'); m bei 4,00 ppm, 1H an C(4'); m bei 3,68 ppm, 2H an C(5'); m bei 2,18 ppm, 2H an C(2'); und s bei 1,8 ppm, 3H an CH₃ an C(5).

Nach 3stdg. Inkubation mit «rohem» Schlangengift von *Crotalus adamanteus* [18] wurde das eingesetzte **14** unverändert zurückerhalten.

8.2. *II_dp* (**15**) aus **6**. 1 g **6** (600 μmol trägergebundenes II_d) wurde mit 3 ml der Stammlösung von β-Cyanoäthylphosphorsäure und 1,95 g (9000 μmol) MS in 5 ml Pyridin wie in 8.1. beschrieben

¹¹⁾ Rf(pT_d)-Wert: Rf-Wert bezogen auf Rf-Wert von pT_d = 1.

¹²⁾ H* ist durch D₂O austauschbar.

zur Reaktion gebracht, anschliessend gereinigt und die Phosphorsäure-Schutzgruppe entfernt. Die Ablösung der Produkte vom polymeren Träger erfolgte in 200 ml Essigsäure/Pyridin 8:2 (*v/v*) bei 70–75° während 2 Tagen. Nach dem Abfiltrieren des Trägermaterials wurde die rotbraune Lösung 5mal mit 20 ml Wasser im Rotationsverdampfer eingedampft. Der zurückbleibende Lack wurde in 20 ml Wasser gelöst und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (66 × 4 cm, Hydrogencarbonat-Form) aufgetragen. Elutionsgradient: Mischgefäss: 2 l H₂O, Vorratsgefäss: 2 l 0,17 M NH₄HCO₃ in H₂O; Fraktionengrösse: 21 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,4 ml/Min.

Fraktionen	Gradient M NH ₄ HCO ₃	OD ₃₀₀	% OD ₃₀₀	Substanz
25–36	0,029–0,042	1100	40	II_d
65–72	0,075–0,084	235	9	
120–132	0,135–0,167	1420	51	II_dP (15)

Wie auch bei 8.1. wurde in den Fraktionen 65–72 eine Substanz gefunden, die im Dünnschichtchromatogramm und in der Elektrophorese gleiche R_f-Werte wie T_d-T_d (**9**) zeigte, jedoch weder mit Milz- noch mit Schlangengift-Phosphodiesterase spaltbar war. Das UV.-Spektrum in Wasser zeigte zwei Maxima bei 300 und 210 nm.

Das Material der Fraktionen 120–132, **II_dP (15)**, war im Dünnschichtchromatogramm in den Systemen B und C mit den R_f-Werten 0,12 und 0,45 einheitlich. $[\alpha]_D^{25} = +86^\circ \pm 2^\circ$ (*c* = 0,95 in Wasser).

Charakterisierung des *Di-ammoniumsalzes* von **II_dP (15)**: UV.-Spektrum in H₂O: Maxima bei 300 und 220 nm. 100-MHz-NMR.-Spektrum in (CD₃)₂SO (¹¹) (vgl. Fig. 2): *d* bei 7,95 ppm, 1H an C(6), *J* = 4 Hz; *t* bei 7,40 ppm, 1H an C(4), *J* = 4 Hz; *br s* bei 6,98 ppm, OH* an C(5') und 8 H* der NH₄⁺-Ionen; *m* bei 6,36 ppm, 3H an C(3), C(5) und C(1'); *m* bei 4,75 ppm, 1H an C(3'); *s* bei 4,14 ppm, 1H an C(4'); *s* bei 3,68 ppm, 2H an C(5'); *m* bei 2,48 ppm, 1H an C(2'); und *m* bei 2,02 ppm, 1H an C(2').

Nach 3stdg. Inkubation mit «rohem» Schlangengift von *Crotalus adamanteus* [18] wurde das eingesetzte **15** unverändert zurückgehalten.

8.3. *T_d-T_dP (16) aus 8*. 330 mg **8** (enthält neben 120 μmol T_d-T_d noch ca. 30 μmol T_d) wurden bei 60° und 0,05 Torr während 2 Tagen getrocknet. 0,74 ml der Stammlösung von β-Cyanoäthylphosphorsäure und 500 mg (2300 μmol) MS in 9 ml Pyridin wurden zum getrockneten Produkt **8** zugegeben. Die Reaktionsbedingungen, die Reinigung des polymeren Trägers, die Abspaltung der Phosphorsäure-Schutzgruppe sowie die Ablösung der Produkte vom Träger wurden wie in 8.1. gewählt. Die wässrige Essigsäurelösung mit den abgelösten Produkten wurde 4mal mit 20 ml Wasser im Rotationsverdampfer eingedampft. Es resultierte ein brauner Lack, der in 20 ml H₂O gelöst und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (60 × 1,5 cm, Hydrogencarbonat-Form) aufgetragen wurde. Elutionsgradient: Mischgefäss: 2 l Wasser, Vorratsgefäss: 2 l 0,2 M NH₄HCO₃ in Wasser; Fraktionengrösse: 22,5 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,6 ml/Min.

Fraktionen	Gradient M NH ₄ HCO ₃	OD ₂₆₄	μmol	%	Substanz
1–5	0 – 0,01	448	46	47	T_d
25–35	0,032–0,040	190	10	10	T_d-T_d (9)
75–87	0,080–0,105	185	19	19	pT_d und T_dP (14)
123–137	0,144–0,160	420	23	24	T_d-T_dP (16)

Aus diesen Werten geht hervor, dass am Träger vor der Phosphorylierung 610 OD₂₆₄ T_d-T_d vorlagen, von denen nach der Reaktion 420 OD₂₆₄ als T_d-T_dP erhalten wurden. **8** konnte somit zu 69% in 3'-Stellung phosphoryliert werden. Das isolierte T_d-T_dP (**16**) war im Dünnschichtchromatogramm in den Systemen B und C mit den R_f-Werten 0,11 und 0,31 sowie in der Elektrophorese bei pH 3,5 mit dem R_f(pT_d)-Wert 1,29 einheitlich. Das UV.-Spektrum in Wasser war mit dem

von T_d - T_d (**9**) identisch. Die Inkubation mit Schlangengift-Phosphodiesterase ergab keine Hydrolyse, hingegen konnte mit Milz-Phosphodiesterase [1] eine vollständige Spaltung von **16** festgestellt werden. Die Spaltprodukte wurden mit Hilfe der Elektrophorese bei pH 3,5 mit dem $R_f(pT_d)$ -Wert 1 als T_{dP} identifiziert.

8.4. II_d - T_{dP} (**17**) aus **10**. 300 mg **10** (enthält neben ca. 90 μ mol II_d - T_d noch ca. 90 μ mol II_d) wurden bei 60° und 0,05 Torr während 2 Tagen getrocknet und anschliessend mit einer Lösung von 0,9 ml der Stammlösung von β -Cyanoäthylphosphorsäure und 590 mg (2700 μ mol) MS in 9 ml Pyridin versetzt. Die Reaktion und die Aufarbeitung des polymeren Trägers wurde bis zum Ablösungsschritt wie in 8.3. beschrieben durchgeführt. Zur Ablösung der Produkte vom Trägermaterial wurden 100 ml Essigsäure/Pyridin 8:2 (*v/v*) verwendet. Nach 2 Tagen bei 70–75° wurde die braune Lösung vom Festkörper abgetrennt und 5mal mit 20 ml Wasser im Rotationsverdampfer eingedampft. Es resultierte ein brauner Lack, der in 10 ml Wasser gelöst und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (66 \times 1,5 cm, Hydrogencarbonat-Form) aufgetragen wurde. Elutionsgradient: Mischgefäss: 2 l Wasser, Vorratsgefäss: 2 l 0,2M NH_4HCO_3 in Wasser; Fraktionen-grösse: 22,5 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,6 ml/Min.

Fraktionen	Gradient M NH_4HCO_3	OD ₃₀₀	% OD ₃₀₀	Substanz
1–10	0 – 0,010	235	46	II_d
20–31	0,022–0,035	110	21	II_d - T_d (11)
66–82	0,072–0,090	70	14	pT_d und II_{dP} (15)
120–137	0,130–0,148	100	19	II_d - T_{dP} (17)

10 konnte somit zu 47% (Zur Berechnung der Ausbeute vgl. 8.3.) in 3'-Stellung phosphoryliert werden. Das Produkt **17** war im Dünnschichtchromatogramm in den Systemen B und C mit den R_f -Werten 0,11 und 0,31 einheitlich. In der Elektrophorese bei pH 3,5 verhielt sich **17** wie **16**. Die Charakterisierung mit Hilfe von Phosphodiesterasen erfolgte wie bei 8.3. Das UV.-Spektrum von **17** in Wasser war mit dem von **11** identisch.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. Falk & Ch. Tamm, *Helv.* 55, 1928 (1972).
- [2] R. B. Merrifield, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 2149 (1963); *idem*, *Science* 150, 178 (1965).
- [3] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin & I. V. Khozhevnikova, *Tetrahedron Letters* 1965, 2323.
- [4] R. L. Letsinger & V. Mahadevan, *J. Amer. chem. Soc.* 88, 5319, (1966); T. Shimidzu & R. L. Letsinger, *J. org. Chemistry* 33, 708 (1968).
- [5] R. L. Letsinger, M. H. Caruthers & D. M. Jerina, *Biochemistry* 6, 1379 (1967).
- [6] H. Hayatsu & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* 89, 3880 (1967).
- [7] F. Cramer, R. Helbig, H. Hettler, K. H. Scheit & H. Seliger, *Angew. Chem.* 78, 640 (1966).
- [8] L. R. Melby & D. R. Strobach, *J. org. Chemistry* 34, 421 (1969).
- [9] T. Kusama & H. Hayatsu, *Chem. pharmac. Bull.* 18, 319 (1970).
- [10] F. Cramer & H. Köster, *Angew. Chem.* 80, 488 (1968).
- [11] W. Freist & F. Cramer, *Angew. Chem.* 82, 358 (1970).
- [12] H. Köster, *Tetrahedron Letters* 1972, 1527.
- [13] K. A. Kun & R. Kunin, *J. Polymer Sci. [B]* 2, 587 (1964).
- [14] D. Braun & E. Seelig, *Chem. Ber.* 97, 3098 (1964).
- [15] K. A. Kun & R. Kunin, *J. Polymer Sci. [A]* 6, 2689 (1968).
- [16] L. R. Melby & D. R. Strobach, *J. Amer. chem. Soc.* 89, 450 (1967).
- [17] U. Séquin, *Dissertation*, Basel 1970.
- [18] U. Séquin & Ch. Tamm, *Helv.* 55, 1196 (1972).
- [19] P. T. Gilham & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 6212 (1958); T. M. Jacob & H. G. Khorana, *ibid.* 86, 1630 (1964).
- [20] G. M. Blackburn, M. J. Brown & M. R. Harris, *J. chem. Soc.* 1969, 676.

- [21] *T. M. Jacob & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. *87*, 368 (1965).
 [22] *G. M. Richards, G. du Vair & M. Laskowsky*, Biochemistry *4*, 501 (1965); *L. A. Heppel & R. J. Hilmoe*, J. biol. Chemistry *209*, 41 (1954).
 [23] *R. L. Letsinger & K. K. Ogilvie*, J. Amer. chem. Soc. *91*, 3350 (1969).
 [24] *H. Kaufmann, P. Mührladt & T. Reichstein*, Helv. *50*, 2287 (1967).
 [25] *H. Gilman, J. A. Beel, C. G. Brannen, M. W. Bullock, G. E. Dunn & L. S. Miller*, J. Amer. chem. Soc. *78*, 1499 (1949).
 [26] *A. I. Vogel* «Practical Organic Chemistry», Longmans, Green and Co. Ltd., London 1962, siehe S. 241.

67. Dielectric Shielding of Ionic Charges in Aqueous Solutions of Different Ionic Strength

by **Luigi Fabbrizzi, Piero Paoletti, Markus C. Zobrist** and **Gerold Schwarzenbach**

Laboratorio C.N.R. e Istituto di Chimica Generale e Inorganica, Università di Firenze, and
 Laboratorium für Anorganische Chemie, Eidg. Technische Hochschule, Zürich

(19. XI. 72)

Summary. The thermodynamic functions of the proton transfer $H_2tn^{2+} + tn \rightarrow 2 Htn^+$ ($tn = 1,3$ -diaminopropane) have been determined in aqueous solutions containing different amounts of KCl ($0.05 \leq \mu \leq 3.01$). The free energy ($-\Delta G$) of the process decreases, whereas the enthalpy ($-\Delta H$) increases with μ . There is reason to believe that the reaction is entirely controlled by the *Coulomb* forces between the two protonic charges. The electrostatic energy involved can be described in terms of a model incorporating an effective dielectric constant ϵ_e , such that $\delta\epsilon_e/\delta\mu$ and $\delta^2\epsilon_e/\delta\mu^2\delta T$ are both positive. The polarisation of pure water is produced by orientation of hydrogen-bonded dipole molecules H_2O , whereas the electrolyte solution is polarised in addition by dislocation of the ions K^+ and Cl^- . Our results demonstrate that the former type of polarisation is much more temperature dependent than the latter.

For the interpretation of the thermodynamic functions of reactions taking place between ions in solution it is useful to separate the simple, long-range coulombic interactions from others, such as covalency, ligand field stabilisation, steric effects *etc.* The energies involved will be designated by A_{el} and E_n respectively, both being taken positive in case of attraction and negative in case of repulsion.

Because of the temperature dependence of the effective dielectric constant ϵ_e , the energy A_{el} is also temperature dependent:

$$A_{el} = \frac{1}{\epsilon_e} \cdot \text{const} \quad (1)$$

$$\frac{\delta A_{el}}{\delta T} = - \frac{A_{el}}{\epsilon_e} \cdot \frac{\delta \epsilon_e}{\delta T} \quad (2)$$

If it is assumed that E_n does not depend on temperature ($\delta E_n/\delta T = 0$), the following expressions for the thermodynamic functions are obtained: