

114. Nucleoside und Nucleotide. Teil 10.
Synthese von Thymidylyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5')-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon¹⁾

von Nico Cerletti und Christoph Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität, St. Johannis-Ring 19, CH-4056 Basel

(18. III. 77)

**Nucleosides and Nucleotides. Part 10. Synthesis of
 Thymidylyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5')-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridone**

Summary

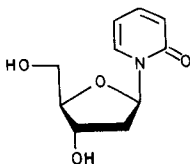
The synthesis of 5'-*O*-monomethoxytritylthymidylyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5')-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridone ((MeOTr)T_{ap}T_{ap}II_a, **5**) and of thymidylyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5')-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridone (T_{ap}T_{ap}II_a, **11**) by condensing (MeOTr)T_{ap}T_a (**3**) and pII_a(Ac) (**4**) in the presence of DCC in abs. pyridine is described. Condensation of (MeOTr)T_{ap}T_{ap} (**6**) with II_a(Ac) (**7**) did not yield the desired product **5** because compound **6** formed the 3'-pyrophosphate. The removal of the acetyl- and *p*-methoxytrityl protecting group was effected by treatment with conc. ammonia solution at room temperature, and acetic acid/pyridine 7:3 at 100°, respectively. Enzymatic degradation of the trinucleoside diphosphate **11** with phosphodiesterase I and II yielded T_a, pT_a and pII_a, T_{ap} and II_a, respectively, in correct ratios.

1. Einleitung. – Modifizierte Nucleoside und Nucleotide sowie deren heterocyclische Basen zeichnen sich nicht nur durch vielfältige biologische Aktivitäten mit potentieller medizinischer Anwendung aus [2–4], sondern sie dienen auch zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen der am Nucleotidstoffwechsel beteiligten Enzyme [5–8]. Je nach der Problemstellung werden dabei Veränderungen am Phosphat- [9], Zucker- [7] [10] oder Basenteil [3] [5–7] eines Nucleotids vorgenommen. Als enzymatische Prozesse von hoher Spezifität haben sich z. B. die exakte Replikation und Transkription der Desoxyribonucleinsäure (DNA) erwiesen. Eine wichtige Voraussetzung zur Erreichung dieser Spezifität ist, neben anderen strukturellen Bedingungen, die Ausbildung von H-Brücken zwischen jeweils zwei der vier natürlichen Basen nach dem Prinzip von *Watson & Crick* [11]. Ein anderes Beispiel für die Bedeutung der H-Brücken zwischen zwei komplementären Basen ist die «Erkennung» des Codons einer m-RNA durch das Anticodon einer t-RNA während der Proteinbiosynthese [12].

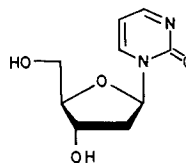
¹⁾ Teil 9, siehe [1].

Nucleotid-Analoga, die aufgrund der modifizierten Struktur ihrer Basen nicht mehr – oder nur noch teilweise – fähig sind, solche H-Brücken zu den natürlichen Vertretern auszubilden, können zu einem besseren Verständnis dieser Vorgänge führen [13]. Zur Untersuchung der Replikation oder Transkription von DNA werden die Triphosphate entsprechender Nucleosidanaloga eingesetzt [14] [15]. Die Abklärung des Mechanismus der Bindungskräfte bei Codon-Anticodon-Wechselwirkungen erfolgt durch den Einsatz von chemisch und enzymatisch hergestellten Trinucleosid-diphosphaten, die zwei natürliche und eine unnatürliche Base wie z. B. 2(1*H*)-Pyridon, 4-Hydroxy-2(1*H*)-pyridon oder 2(1*H*)-Pyrimidon enthalten [16]. In diesem Zusammenhang ist auch über die Synthese verschiedener Dinucleosid-monophosphate mit 2(1*H*)-Pyridon, 3(2*H*)-Pyridazon, 2(1*H*)-Pyrimidon und 4(3*H*)-Pyrimidon berichtet worden [5] [17].

Unsere eigenen aufgrund solcher Überlegungen bisher durchgeführten Arbeiten über Desoxyribonucleotidderivate mit 2(1*H*)-Pyridon bzw. 2(1*H*)-Pyrimidon als Basen haben zur Synthese verschiedener Dinucleosid-monophosphate und Dinucleotide geführt [1] [18–21], die, als Bausteine, eines der vier natürlichen Nucleotide, sowie 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon (*II*_d, **1**)²⁾ [22], bzw. 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidon (**2**) [15] enthalten.



1



2

Im Rahmen eines generellen Konzepts, über das wir zu gegebener Zeit berichten werden, haben wir nun das geschützte Trinucleosid-diphosphat 5'-*O*-Monomethoxytritylthymidyl-(3'-5')-thymidyl-(3'-5')-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon ((MeOTr)T_{ap}T_{ap}*II*_d, **5**) und das entsprechende freie Trinucleosid-diphosphat T_{ap}T_{ap}*II*_d (**11**) synthetisiert. Dabei sind wir nach der bekannten, von allem von *Khorana et al.* ausgearbeiteten Diestermethode vorgegangen, wobei folgende Schutzgruppen verwendet wurden: *p*-Methoxytrityl [23] für die 5'-Hydroxygruppe, Acetyl für die 3'-Hydroxygruppe [24] und β -Cyanoäthyl für den Phosphorsäurerest [25]. Als Kondensationsmittel wurden *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 2,4,6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid (TPS) verwendet³⁾⁴⁾.

2. Wahl des Syntheseweges. – Für die Synthese von (MeOTr)T_{ap}T_{ap}*II*_d (**5**) nach der Diestermethode bieten sich zwei Wege an:⁵⁾

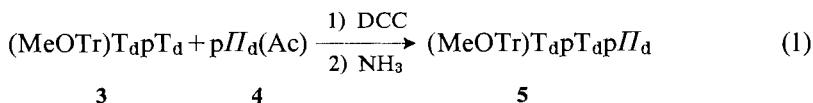
²⁾ Zu den Abkürzungen vgl. [22].

³⁾ Die erwähnten Schutzgruppen und Kondensationsmittel haben sich bei der Synthese vieler Oligonucleotide bewährt, vgl. [26] [27].

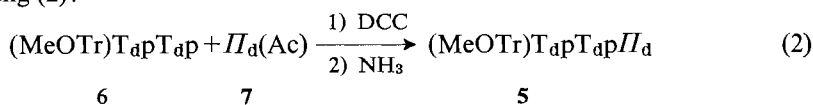
⁴⁾ Zum Mechanismus der Kondensationsreaktion vgl. [28].

⁵⁾ Siehe auch *Schema 2*.

(a) Kondensation einer 3'-Hydroxygruppe mit einer 5'-Phosphatgruppe (vgl. z. B. [24]), was im vorliegenden Fall zu Gleichung (1) führt:



(b) Kondensation einer 3'-Phosphatgruppe mit einer 5'-Hydroxygruppe (vgl. [29]) nach Gleichung (2):



Die Ausbeuten der beiden Verknüpfungsarten sollen nach den Angaben der Literatur bei geeigneter Wahl der Konzentrationen für Reaktanden dieser Kettenlänge praktisch gleich hoch sein [29]. Wegen der leichteren Zugänglichkeit der benötigten Reaktanden wird meistens nach Variante (a) vorgegangen. Im vorliegenden Fall war das Kriterium für die Wahl des Syntheseweges die Bedingung, mit der begrenzten Menge an unnatürlichem Nucleosid **1**, bzw. mit dessen Methoxytrityl-Derivat **8** möglichst wenige Reaktionen ausführen zu müssen, um dadurch eine optimale Ausbeute an geschütztem Reaktand **4** bzw. **7** zu erreichen (vgl. Gleichungen (1) und (2)).

Da einerseits die selektive Phosphorylierung von Π_{d} (**1**) in 5'-Stellung mit Phosphorsäure-bis[2, 2, 2-trichloräthylester]chlorid nach der Methode von *Eckstein & Scheit* [30] bisher unbefriedigend verlaufen war (vgl. [22])⁶, andererseits die Reaktionen zur Synthese von $\Pi_{\text{d}}(\text{Ac})$ (**7**) (s. unten) gute Ausbeuten liefern sollten, wählten wir den Weg (b).

Das dazu benötigte $(\text{MeOTr})\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}\text{p}$ (**6**) wurde durch Phosphorylierung von $(\text{MeOTr})\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}$ (**3**)⁷ mit β -Cyanoäthylphosphat und TPS nach *Falk & Tamm* [33] in 70% Ausbeute erhalten.

3. 1-(3'-O-Acetyl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon ($\Pi_{\text{d}}(\text{Ac})$, **7).** – Zur Herstellung von $\Pi_{\text{d}}(\text{Ac})$ (**7**) wurde $(\text{MeOTr})\Pi_{\text{d}}$ (**8**) [19] mit abs. Pyridin und Essigsäureanhydrid behandelt. Nach Umsetzen des überschüssigen Reagens mit Methanol und Eindampfen der Lösung im Hochvakuum wurde die Abspaltung der *p*-Methoxytritylgruppe von $(\text{MeOTr})\Pi_{\text{d}}(\text{Ac})$ (**9**) unter den speziell für die Enttritylierung des nicht acetylierten Nucleosids $(\text{MeOTr})\Pi_{\text{d}}$ (**8**) ausgearbeiteten Bedingungen (Eisessig/Pyridin 7:3, 100°) (vgl. [19]) vorgenommen. Dadurch liess sich die sonst in saurer Lösung leicht erfolgende Spaltung der glykosidischen Bindung vermeiden⁸). Die

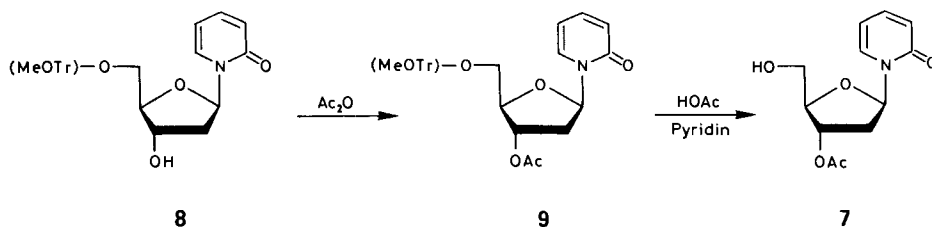
⁶) Wie neuere Versuche in unserem Laboratorium [20] gezeigt haben, kann Π_{d} (**1**) bei Anwendung der Methode von *Yoshikawa* [31] mit Phosphorylchlorid (POCl_3) selektiv in 5'-Stellung mit einer Ausbeute von 80–85% phosphoryliert werden, sofern spezielle Reaktionsbedingungen eingehalten werden.

⁷) Hergestellt nach *Khorana et al.* [32]. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel (vgl. [13]).

⁸) Neuere Versuche in unserem Laboratorium [20] haben gezeigt, dass $(\text{MeOTr})\Pi_{\text{d}}$ (**8**) auch durch Behandlung mit 80proz. Essigsäure bei RT. [34] enttrityliert werden kann, ohne gleichzeitig die glykosidische Bindung zu spalten.

Reaktion verlief überraschenderweise äusserst langsam und war erst nach 7 Std. beendet. Die analoge Enttritylierung von (MeOTr) II_d (**8**) zu II_d (**1**) benötigt lediglich 30 Min. [19]. Ob für diesen starken Reaktivitätsunterschied sterische und/oder andere Gründe verantwortlich sind, ist nicht abgeklärt. Nach Reinigung des Rohproduktes an einer Kieselgelsäule und mehrmaligem Umkristallisieren resultierte reines krist. II_d (Ac) (**7**).

Schema 1



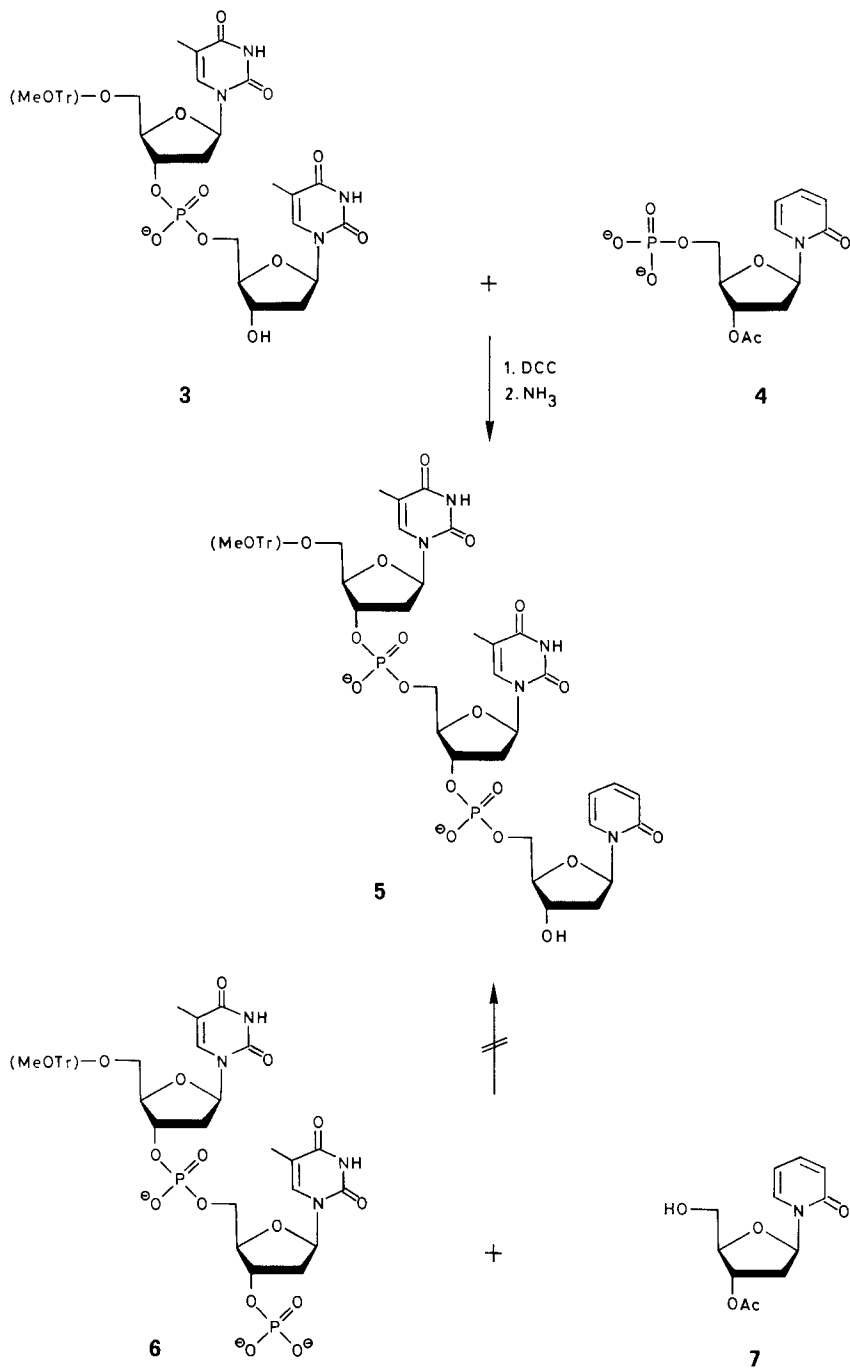
Die geringe Ausbeute von 30% ist wahrscheinlich auf die lange Reaktionsdauer bei der Enttritylierung zurückzuführen, die, wie im Dünnschichtchromatogramm festgestellt werden konnte, zu mehreren Sekundärprodukten führt.

Das acetylierte Nucleosid **7** zeigte im UV. ein Absorptionsmaximum bei 303 nm ($\epsilon = 5900$) (vgl. $\epsilon = 6040$ für das ungeschützte **1** [22]). Die Acetylgruppe war im IR.-Spektrum durch die typische Bande für Estergruppen bei 1730 cm^{-1} und im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum durch ein scharfes Singulett bei 2,07 ppm, dessen Integral 3 Protonen entspricht, erkennbar. Das Multipllett des C(3')-Protons der Desoxyribose ist aufgrund der Elektronegativität der Acetylgruppe von 4,47 ppm in II_d (**1**) nach 5,35 ppm verschoben. Die Lage des Signals der beiden Protonen an C(5') ist jedoch gegenüber demjenigen des freien Nucleosids **1** fast unverändert. Die übrigen Signale entsprechen den für den Nucleosidrest von II_d erwarteten Werten. Diese Befunde sprechen für die gewünschte 3'-Stellung der Acetylgruppe und für eine freie 5'-Hydroxygruppe.

Als zusätzlicher Beweis für die letztere wurde **7** mit *p*-Methoxytritylchlorid in abs. Pyridin umgesetzt. Im Dünnschichtchromatogramm des Reaktionsgemisches war eine tritylhaltige Verbindung nachweisbar, die sich durch Behandeln mit konz. NH_3 -Lösung in (MeOTr) II_d (**8**) überführen liess.

4. Versuche zur Kondensation von (MeOTr) $T_{ap}T_{ap}$ (6**) mit II_d (Ac) (**7**)** (vgl. Schema 2).– Das 3'-Phosphat **6** wurde mit dem Nucleosid **7** in Gegenwart von DCC bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach 5 Tagen wurde hydrolysiert und die Acetylgruppe mit konz. NH_3 -Lösung entfernt. Chromatographie des Rohproduktes an DEAE-Sephadex lieferte zwar als Hauptprodukt eine tritylhaltige Verbindung mit der etwa erwarteten Polarität, doch zeigte das UV.-Spektrum ein Absorptionsmaximum bei 267 nm und nicht bei 300 nm, wie sie für eine Verbindung, die das Nucleosid II_d (**1**) enthält, charakteristisch ist. Ausserdem wurde die gesamte Menge eingesetztes Nucleosid in Form der ungeschützten Verbindung **1** in den ersten Fraktionen der DEAE-Sephadex-Säule aufgefunden. Im Laufe der weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass sich die gleiche, oben erwähnte Verbindung aus dem Reaktand **6** allein mit DCC oder TPS schon nach 5 bis 10 Min. zu bilden beginnt. Vermutlich handelt es sich bei dieser unerwünschten Verbindung um das aus (MeOTr) $T_{ap}T_{ap}$ (**6**)

Schema 2



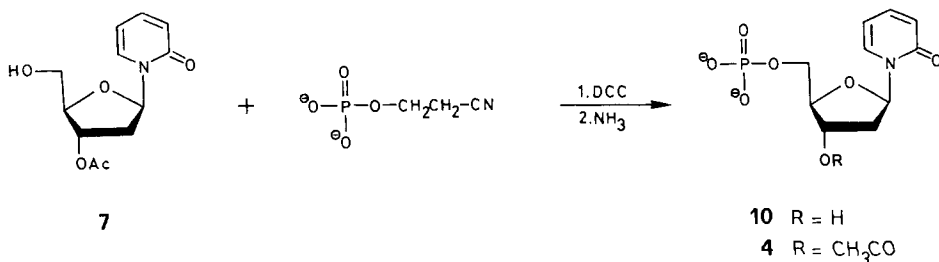
hervorgegangene Pyrophosphat $(\text{MeOTr})\text{T}_{\text{ap}}\text{T}_{\text{d}}\text{-3'-pp-3'-T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}(\text{MeOTr})$. Ein derartiges Zwischenprodukt wird bei der Kondensationsreaktion mit DCC angenommen (vgl. [28]). Weder durch Variation der Konzentration der Reaktanden, der Reaktionsdauer oder durch Erhöhen der Temperatur auf 40° , noch durch Verwenden von TPS als Kondensationsmittel trat die erwünschte Reaktion ein.

Die von uns versuchte Kondensation von $(\text{MeOTr})\text{T}_{\text{ap}}\text{T}_{\text{ap}}$ (6) und $\text{II}_{\text{d}}(\text{Ac})$ (7) ist im Prinzip eine Analogreaktion zu der von *Weimann & Khorana* [29] beschriebenen Synthese von $(\text{Tr})\text{T}_{\text{ap}}\text{T}_{\text{ap}}\text{T}_{\text{d}}$ aus $(\text{Tr})\text{T}_{\text{ap}}\text{T}_{\text{ap}}$ und $\text{T}_{\text{d}}(\text{Ac})$, die das tritylierte Trinucleosid-diphosphat in einer Ausbeute von 47% ergab. Die beiden Reaktionen unterscheiden sich lediglich durch die Schutzgruppen des 5'-Hydroxyls (*p*-Methoxytrityl- bzw. Trityl-) und das acetylierte Nucleosid ($\text{II}_{\text{d}}(\text{Ac})$, bzw. $\text{T}_{\text{d}}(\text{Ac})$). Von ausschlaggebender Bedeutung dürfte dabei die Verschiedenheit der beiden Nucleoside sein. Obwohl bisher keine experimentellen Daten vorliegen, nehmen wir an, dass eine herabgesetzte Reaktivität von $\text{II}_{\text{d}}(\text{Ac})$ für das Ausbleiben der Kondensation verantwortlich ist. Ein Hinweis – wenn auch in anderem Zusammenhang – auf die veränderte Reaktivität der 5'-Hydroxygruppe des unnatürlichen Nucleosids durch die Acetylierung der 3'-Hydroxygruppe ist auch die verlangsamte Enttritylierung von $(\text{MeOTr})\text{II}_{\text{d}}(\text{Ac})$ (9) zu $\text{II}_{\text{d}}(\text{Ac})$ (7) im Vergleich zur Bildung von II_{d} (1) aus $(\text{MeOTr})\text{II}_{\text{d}}$ (8) (s. oben).

Diese negativen Ergebnisse zwangen uns, die Synthese von $(\text{MeOTr})\text{T}_{\text{ap}}\text{T}_{\text{ap}}\text{II}_{\text{d}}$ (5) nach Variante (a) durchzuführen (vgl. Gleichung (1)).

5. 1-(5'-O-Phosphoryl-3'-O-acetyl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon ($\text{pII}_{\text{d}}(\text{Ac})$, 4). – Für die Herstellung des benötigten $\text{pII}_{\text{d}}(\text{Ac})$ (4) wurde das acetylierte Nucleosid $\text{II}_{\text{d}}(\text{Ac})$ (7) mit β -Cyanoäthylphosphat und DCC in abs. Pyridin bei Raumtemperatur phosphoryliert. Die Reaktionsbedingungen und die Aufarbeitung wurden gegenüber der Vorschrift von *Tener* [35] für die Phosphorylierung von $\text{T}_{\text{d}}(\text{Ac})$ etwas verändert. Die Entfernung der Cyanoäthylschutzgruppe erfolgte mit konz. NH_3 -Lösung, wodurch gleichzeitig die Acetoxygruppe am C(3') verseift wurde. Nach der Reinigung des Rohproduktes an einer DEAE-Sephadex-Säule mit einem Ammoniumhydrogencarbonat-Gradienten wurde das 5'-Nucleotid pII_{d} (10) in einer Ausbeute von 83% erhalten. Zusätzlich fielen 10% des Nucleotids, das noch eine Cyanoäthylgruppe trug, an. Das Produkt war mit einer Probe, die früher durch direkte Phosphorylierung von II_{d} (1) erhalten worden war [22], identisch, zeigte im UV. ein Absorptionsmaximum bei 298 nm und wurde durch die 5'-Nucleotidase von *Crotalus atrox* vollständig in das freie Nucleosid II_{d} (1) und Phosphat gespalten.

Schema 3



Die Phosphorylierung von $II_d(\text{Ac})$, die ohne besondere Schwierigkeiten durchgeführt werden konnte, zeigt, dass die Kondensation der 5'-Hydroxygruppe von **7** mit dem Phosphorsäureester eines primären Alkohols (β -Cyanoäthylphosphat) möglich ist, im Gegensatz zur Kondensation mit dem Phosphorsäureester eines sekundären Alkohols ((MeOTr) $T_{ap}T_{ap}$) (vgl. oben).

Das Ammonium-Salz von pII_d wurde mit Dowex 50 W (Pyridinium-Form) in das Pyridinium-Salz übergeführt, das in abs. Pyridin mit einem Überschuss Essigsäureanhydrid bei Raumtemperatur behandelt wurde. Nach Lyophilisieren erhielten wir das acetylierte Mononucleotid **4** in einer Ausbeute von 88%.

Das UV.-Absorptionsmaximum von $pII_d(\text{Ac})$ liegt wie beim freien Nucleotid pII_d bei 298 nm. Die Ester-carbonylschwingung der 3'-O-Acetylgruppe ist im IR.-Spektrum bei 1735 cm^{-1} festzustellen. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erscheint die Acetylgruppe bei 1,94 ppm als scharfes Singulett. Die Struktur von $pII_d(\text{Ac})$ (**4**) ist somit gesichert.

6. (MeOTr) $T_{ap}T_{ap}II_d$ (5**) aus (MeOTr) $T_{ap}T_d$ (**3**) und $pII_d(\text{Ac})$ (**4**)** (vgl. Gl. (1) und Schema 2). – Die Kondensation zwischen dem tritylierten Dinucleosid-monophosphat **3** und der vierfachen Menge an acetyliertem Nucleotid **4** erfolgte mit einem 20fachen Überschuss an DCC in abs. Pyridin. Nach 6 Tagen Reaktionsdauer wurde das überschüssige Kondensationsmittel hydrolysiert, der entstandene Dicyclohexylharnstoff abgetrennt und das Rohprodukt zur Entfernung der endständigen Acetylgruppe mit konz. NH_3 -Lösung behandelt. Die Trennung des Reaktionsgemisches auf einer DEAE-Sephadex-Säule gelang durch Eluierung mit Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung in zwei Stufen⁹⁾. Zuerst wurde ein wässriger Gradient der Konzentration 0–0,1 M verwendet, womit die Eluierung von nicht umgesetztem (MeOTr) $T_{ap}T_d$ (**3**) (8,3%) erreicht wurde. Anschliessend wurde mit einem Gradienten von 0–0,25 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung in 30proz. Äthanol eluiert. Die Reihenfolge der Eluierung war dabei: 1) Mononucleotid pII_d (**10**) (37,5% des eingesetzten Materials), 2) das aus pII_d in der Kondensationsreaktion entstandene 5'-Pyrophosphat $II_d5'pp5'II_d$ (20,5%) und 3) das erwünschte Produkt (MeOTr) $T_{ap}T_{ap}II_d$ (**5**). Nach der Entfernung des Ammoniumhydrogencarbonats durch wiederholtes Abdampfen mit Methanol/Wasser wurde die wässrige Lösung lyophilisiert. Es resultierte reines (MeOTr) $T_{ap}T_{ap}II_d$ (**5**) in einer Ausbeute von 70%.

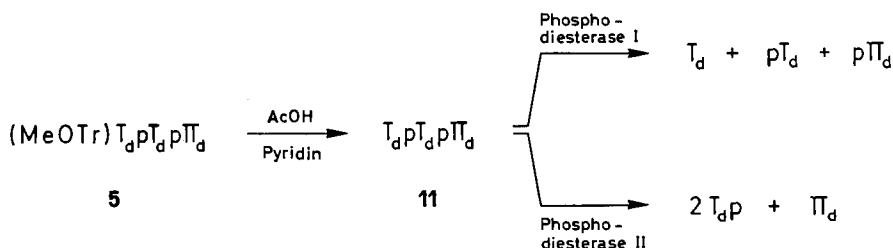
Das UV.-Spektrum von **5** in Äthanol/Wasser 1:1 weist ein Absorptionsmaximum bei 268 nm ($\epsilon = 18240$) auf, was auf die zwei Thyminchromophoren deutet, und eine Schulter bei 301,5 nm ($\epsilon = 5140$), die vom 2(1H)-Pyridon-Teil der Molekel stammt.

Die Tritylgruppe und die Zuckerbestandteile der Verbindung waren im Dünnschichtchromatogramm an ihrer charakteristischen Gelb- bzw. Schwarzfärbung nach Besprühen mit 10proz. Perchlorsäure-Lösung und anschliessendem Erhitzen zu erkennen.

Als weiterer Strukturbeweis diente nach der Entfernung der Tritylgruppe (s. unten) die enzymatische Spaltung des Präparates mit Hilfe der Phosphodiesterasen I und II (vgl. exper. Teil).

⁹⁾ Zur Reinigung von Oligonucleotiden, die lipophile Schutzgruppen wie Trityl-, Anisoyl- und/oder Benzoylgruppen etc. enthalten, durch Ionenaustauscherchromatographie, vgl. [32] [36].

7. $T_{ap}T_{ap}II_d$ (11) aus $(MeOTr)T_{ap}T_{ap}II_d$ (5). – Die Abspaltung der *p*-Methoxytritylgruppe von $(MeOTr)T_{ap}T_{ap}II_d$ erfolgte durch Behandeln mit Eisessig/Pyridin 7:3 bei 100° während 50 Min. Nach Entfernen der Essigsäure wurde das Rohprodukt an einer DEAE-Sephadex-Säule mit einem linearen Ammoniumhydrogencarbonat-Gradienten gereinigt. Das Trinucleosid-diphosphat 11 wurde bei einer Ionenkonzentration von 0,06–0,07M eluiert und fiel nach dem Lyophilisieren in einer Ausbeute von 91% an. Das dünnschichtchromatographisch einheitliche Präparat wies im UV. ein Absorptionsmaximum bei 268 nm und eine Schulter bei 302 nm (in Wasser) auf.



Der enzymatische Abbau von 11 mittels der Phosphodiesterasen I und II aus Schlangengift bzw. Milz war vollständig und führte zu den Spaltprodukten T_d , pT_d und pII_d , bzw. $2T_{ap}$ und II_d , in den erwarteten Verhältnissen. Eine Spaltung der glykosidischen Bindung von II_d während der Enttritylierung von $(MeOTr)T_{ap}T_{ap}II_d$ ist somit nicht eingetreten.

8. **Schlussbemerkungen.** – Das unnatürliche Nucleosid II_d (1) wurde in früher beschriebenen Kondensationsreaktionen immer in Form eines geschützten Derivates mit freier 3'-Hydroxygruppe eingesetzt [1] [18–20]. Wir konnten damals zeigen, dass II_d mit allen vier natürlichen Desoxyribonucleotiden zu Dinucleosid-monophosphaten und Dinucleotiden kondensiert werden kann. Die nun anhand der Synthese von $(MeOTr)T_{ap}T_{ap}II_d$ (5) und des enttritylierten Derivates $T_{ap}T_{ap}II_d$ (11) gewonnenen Ergebnisse haben bewiesen, dass II_d auch als in 3'-Stellung geschütztes 5'-Phosphat $pII_d(Ac)$ (4) (in Kombination mit den natürlichen Nucleotiden) zum Aufbau von Oligonucleotiden verwendet werden kann. Die tritylierte Verbindung 5 kann dank ihrer freien 3'-Hydroxygruppe mittels weiterer Kondensationsreaktionen zu einer Oligonucleotidkette, die das unnatürliche Nucleotid pII_d (10) enthält, aufgebaut werden. Wir hoffen, anhand derartiger Oligonucleotide den Einfluss des nicht natürlichen Bestandteils auf die Struktur und Eigenschaften der Gesamtmolekel untersuchen zu können.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekte Nr. 2.294.0.74 und 2.435.0.75) für die gewährte Unterstützung.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Die Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert (Fehler $\pm 2^\circ$). Substanzproben für die Elementaranalyse, die im mikroanalytischen Laboratorium unseres Instituts ausgeführt wurden (E. Thommen), wurden bei 40–50° und 0,02 Torr getrocknet. – Die 90 MHz- 1H -NMR.-Spektren wurden mit einem Bruker WH-90-Spektrometer mit Fourier-Transform, die UV.-Spektren mit einem Beckman-UV.-Spektrometer, Modell DK2, und die IR.-

Spektren mit einem *Perkin-Elmer*-Gitterspektrometer, Modell 125, im Spektrollaboratorium unseres Instituts (*K. Aegerter*) aufgenommen. – Für die Ionenaustauscherchromatographie wurde *DEAE-Sephadex A 25* der Fa. Pharmacia, Uppsala, verwendet. Die Eluierung der Substanzen erfolgte jeweils mit einem linearen Gradienten von Ammoniumhydrogencarbonat (*AnalaR, BDH*) und wurde mit einem *Uvicord I*-Analyseur von *LKB*, Stockholm, kontrolliert. Um einen Verlust von CO_2 aus der Pufferlösung zu vermeiden, wurde ein schwacher Strom von CO_2 durch die Lösung im Mischgefäß geleitet. – Für die Säulenchromatographie verwendeten wir Kieselgel der Fa. *E. Merck AG.*, Darmstadt (Korngrösse 0,05–0,20 mm). Die Papierchromatographie erfolgte auf Papier *Whatman 3MM*, wobei die absteigende Technik zur Anwendung kam. – Zur Dünnschichtchromatographie (DC.) dienten DC.-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} (Schichtdicke 0,25 mm) von *E. Merck AG.*, Darmstadt. Die Substanzeleuchte wurden im UV.-Licht, durch Einwirken von Joddämpfen und durch Besprühen mit 10proz. Perchlorsäure-Lösung mit anschliessendem Erhitzen auf 150–200° sichtbar gemacht. – Fliessmittelsysteme für die Chromatographie (v/v): A): Chloroform/Methanol 1:1; B): 1-Butanol/Eisessig/Wasser 5:2:3; C): 2-Propanol/konz. Ammoniak-Lösung/Wasser 7:1:2; D): Methylenchlorid/Methanol 9:1; E): Äthanol/1M Ammoniumacetat, pH 7,5, 7:3; F): 1-Propanol/Wasser/konz. Ammoniak-Lösung 6:3:1. – Das Eindampfen von Lösungen erfolgte im Rotationsverdampfer (RV.) bei 25–35° und 14 Torr. – Für die Kondensationsreaktionen wurden die verwendeten Nucleotide in Form ihrer Pyridinium-Salze eingesetzt. Pyridin (*purissimum p.a. Fluka*, Buchs) wurde über Molekularsieb 4 Å (*Union Carbide*) aufbewahrt.

5'-*O*-Monomethoxytritylthymidyl-(3'-5')-thymidin ((MeOTr) $\text{T}_{\text{ap}}\text{T}_{\text{d}}$, **3**) wurde aus 5'-*O*-Monomethoxytritylthymidin ((MeOTr) T_{d}) und 3'-*O*-Acetylthymidin-5'-phosphat (p T_{d} (Ac)) nach der von *Khorana et al.* [32] beschriebenen Methode hergestellt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels präp. DC. in Fliessmittel A (Plattengrösse 10 × 20 cm, Laufstrecke ca. 7,5 cm) (vgl. dazu [1] [13]). Das Präparat war im DC. in den Fliessmitteln B, C, E und F einheitlich, zeigte in Wasser ein UV.-Maximum bei 267 nm und war mit einer Referenzprobe identisch.

5'-*O*-Monomethoxytritylthymidyl-(3'-5')-thymidin-3'-phosphat ((MeOTr) $\text{T}_{\text{ap}}\text{T}_{\text{ap}}$, **6**) wurde nach *Falk & Tamm* [33] durch Phosphorylierung von (MeOTr) $\text{T}_{\text{ap}}\text{T}_{\text{d}}$ (**3**) mit β -Cyanoäthylphosphat erhalten. Die Ausbeute an **6** konnte dabei gegenüber der Literatur von 36% auf 70% gesteigert werden. Das Präparat war im DC. (Fliessmittel B und C) einheitlich, wies ein UV.-Maximum bei 267 nm auf (in Wasser) und war mit einer Referenzprobe identisch.

1-(5'-*O*-Monomethoxytrityl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon ((MeOTr) II_{d} , **8**) wurde nach dem früher beschriebenen Verfahren [19] synthetisiert. Die in den DC.-Fliessmitteln A, B und D einheitliche Verbindung stimmte in den UV.- und IR.-Daten mit den Literaturwerten überein.

2-1-(3'-*O*-Acetyl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon (II_{d} (Ac), **7**) aus (MeOTr) II_{d} (**8**). Eine Lösung von 986 mg (2 mmol) (MeOTr) II_{d} (**8**) in 10 ml Pyridin wurde mit 6 ml (63 mmol) Essigsäureanhydrid 18 Std. bei 23° stehengelassen. Zum gelblichen Gemisch wurden dann unter Kühlen mit Eis 10 ml Methanol gegeben und weitere 16 Std. stehengelassen. Anschliessend wurde i. HV. eingengt, mit 21 ml Eisessig und 9 ml Pyridin versetzt und die Lösung auf dem Dampfbad erhitzt. Die Abspaltung der *p*-Methoxytritylgruppe wurde im DC. verfolgt. Nach insgesamt 7 Std. waren nur noch geringe Mengen des tritylierten Nucleosids (MeOTr) II_{d} (Ac) (**9**) vorhanden. Ausserdem wurde eine beträchtliche Abspaltung der Base vom Zuckerrest festgestellt. Die stark gelb gefärbte Lösung wurde abgekühlt und 6mal mit je 30 ml Äther ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde eingengt, durch mehrmaliges Abdampfen mit Methanol i. V. das Wasser völlig entfernt und der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte an einer Kieselgelsäule (3 × 25 cm) mit Methylenchlorid/Methanol. Es wurden Fraktionen von je 100 ml genommen.

Mehrmaliges Umkristallisieren aus Aceton/Äther/Pentan ergab II_{d} (Ac) (**7**) in farblosen Kristallen vom Smp. 105–107°. Die Ausbeute betrug 154 mg (30%). – UV. (Äthanol): 198,5 (14450), 228 (6025), 303 (5900) nm (ϵ). – IR. (CHCl_3): u. a. Banden bei 3630 und 3380 (br.) (5'-OH), 1730 (C=O; Ester), 1655 cm^{-1} (C=O; Pyridonring). – 90 MHz- ^1H -NMR. (CDCl_3): 7,98, $d \times d$, $J=7$ und 2 Hz, 1H, H-C(6); 7,39, $d \times d \times d$, $J=8,5$, 6,5 und 2 Hz, 1H, H-C(4); 6,42, $d \times d$, $J=8$ und 6 Hz, 1H, H-C(1'); 6,35, d br., $J=8,5$ Hz, 1H, H-C(3); 6,23, $t \times d$, $J=6,5$ und 1,5 Hz, 1H, H-C(5); 5,35, m , 1H, H-C(3'); 4,46, t , $J=5$ Hz, HO-C(5) (mit D_2O austauschbar); 4,15, m , 1H, H-C(4'); 3,84, $d \times d$, $J=5$ und 3 Hz, 2H, 2H-C(5'); 2,51, m , 2H, 2H-C(2'); 2,07, s , 3H, $\text{CH}_3\text{CO-O-C}(3')$.

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ (253,25) Ber. C 56,91 H 5,97% Gef. C 57,02 H 6,23%

3. *Versuche zur Kondensation von (MeOTr)T_{ap}T_{ap} (6) und II_a(Ac) (7)*. 34,2 mg (0,03 mmol) (MeOTr)T_{ap}T_{ap} (6) und 9,3 mg (0,036 mmol) II_a(Ac) (7) wurden 3mal durch Eindampfen der Lösung i. HV. in je 2 ml Pyridin getrocknet. Der Rückstand wurde in 1 ml Pyridin gelöst und mit 39,2 mg (0,19 mmol) DCC 5 Tage bei 23° im Dunkeln gerührt. Dann wurde unter Eiskühlung 1 ml Wasser zugegeben und weitere 6 Std. bei 23° gerührt. Nach Verdünnen mit 5 ml Pyridin/Wasser 1:1 und Abtrennen des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs über einer Fritte, wurde mit 5 ml des gleichen Gemisches gewaschen, anschliessend wurde i. V. eingengt und 3mal zwischen je 20 ml Wasser und 20 ml Äther ausgeschüttelt, wobei die ätherischen Phasen 2mal mit Wasser gewaschen wurden. Die organische Phase enthielt vor allem Dicyclohexylharnstoff und geringe Spuren zweier tritylhaltiger Verbindungen. Die wässrige Phase enthielt II_a(Ac) (7) und neben mehreren geringen Verunreinigungen ein tritylhaltiges Hauptprodukt, das sich im DC. deutlich von (MeOTr)T_{ap}T_{ap} (6) unterschied (vgl. Tabelle der Rf-Werte). Die wässrige Lösung wurde i. V. auf 1–2 ml eingengt und mit 1 ml Pyridin und 20 ml konz. Ammoniak-Lösung versetzt. Nach 16 Std. Stehen bei 23° wurde i. V. eingengt und die wässrige Lösung auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1 × 40 cm, Hydrogencarbonatform) gegeben. Linearer Eluierungsgradient: Mischgefäss: 2 l 0,1 M NH₄HCO₃ in 10proz. 2-Propanol; Vorratsgefäss: 2 l 0,4 M NH₄HCO₃ in 25proz. 2-Propanol; Fraktionengrösse: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient κ _M NH ₄ HCO ₃ κ =	OD.-λ(max)- Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf eingesetztes 6 bzw. 7	Substanz
1– 14	0,1 – 0,12	216	97	II _a (1)
88–125	0,25–0,31	222	39	(MeOTr)T _{ap} T _{ap} (MeOTr)T _{ap} T _{ap}

Die weiteren, analog durchgeführten Reaktionen, die ebenfalls nicht zur erwünschten Kondensation von 6 und 7 führten, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. *Versuche zur Kondensation von 6 und 7*

(MeOTr)T _{ap} T _{ap} (6)	II _a (Ac) (7)	DCC	TPS	Molare Konzentration von 6	Temperatur/ Reaktions- dauer (Std.)
1 ^{a)}	1,2 ^{a)}	6,3 ^{a)}	–	0,03	23°/120
1	1,2	–	5,2	0,003	23°/4,5
1	6,8	–	13	0,004	23°/4
1	5,6	14	2 ^{b)}	0,002	23°/24
1	5,6	12	–	0,004	40°/72
1	7,1	25	–	0,004	23°/84
1	8,1	25	–	0,004	23°/84

^{a)} Anzahl Mol.-Äquiv.

^{b)} Nach 24 Std. wurde zusätzlich TPS zugegeben und weitere 24 Std. reagieren gelassen.

4. *1-(5'-O-Phosphoryl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (pII_a, 10)*. 79 mg (0,31 mmol) II_a(Ac) (7) und 1,6 ml einer 1 M Lösung von β-Cyanoäthylphosphat in abs. Pyridin wurden 3mal mit je 1 ml Pyridin i. HV. eingedampft. Der Rückstand wurde in einer Lösung von 6,5 g (31 mmol) DCC in 15 ml Pyridin aufgenommen, bei 23° im Dunkeln gerührt und nach 3 Tagen unter Eiskühlung mit 80 ml Wasser versetzt. Zusätzlich wurden 10 ml Äthanol zugegeben, um eine entstandene Emulsion zu lösen. Nach Abtrennen des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs auf einer Fritte nach 12 Std. und Waschen des Rückstandes mit Wasser/Pyridin 4:1 wurde die klare Lösung 3mal mit je 100 ml Äther ausgeschüttelt und die organischen Phasen anschliessend 2mal mit je 20 ml Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden i. V. unter Zusatz von Pyridin auf ca. 10 ml eingengt, wobei

erneut ausgefallener Dicyclohexylharnstoff wie oben beschrieben nochmals abgetrennt wurde. Anschliessend wurden 50 ml konz. Ammoniak-Lösung und 5 ml Pyridin zugegeben und bei 23° während 24 Std. stehengelassen (Abspaltung der Acetyl- und Cyanoäthylgruppe). Nach Eindampfen wurde das Rohprodukt auf eine *DEAE-Sephadex*-Säule (1 × 90 cm, Hydrogencarbonatform) gegeben. Linearer Eluierungsgradient: Mischgefäss: 3 l H₂O; Vorratsgefäss: 3 l 0,1 M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient × M NH ₄ HCO ₃ × =	OD. ₂₉₈ - Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf eingesetztes <i>II</i> _a (Ac) (7) ^{a)}	Substanz
66–74	0,025–0,028	155	8	(CNEt)p <i>II</i> _a
173–189	0,066–0,072	1510	83	p <i>II</i> _a (10)

a) Spektroskopisch bestimmt.

Die wässrige Lösung der vereinigten Fraktionen Nr. 173–189 wurde eingedampft und das NH₄HCO₃ durch wiederholtes Einengen mit Methanol/Wasser 9:1 entfernt (Geruchsprobe auf Ammoniak). Das Mononucleotid **10** (Ausbeute 83%) war im DC. einheitlich (Fließmittel B, C, E und F) und wies im UV. in Wasser ein Maximum bei 298 nm auf. Es wurde durch 5'-Nucleotidase zu *II*_a (**1**) gespalten und war mit einer auf anderem Wege durch *Séquin & Tamm* [22] hergestellten Referenzprobe identisch.

Das Ammonium-Salz von p*II*_a – gelöst in 10 ml Wasser – wurde auf eine Pyridinium-Dowex-50-Säule (2 × 25 cm) gegeben und mit Wasser langsam von der Säule wieder eluiert. Anschliessend wurde die wässrige Lösung unter Zusatz von Pyridin i. V. eingengt. Durch mehrmaliges Eindampfen i. HV. mit Pyridin wurde schliesslich eine Lösung des Pyridinium-Salzes von p*II*_a (**10**) in abs. Pyridin hergestellt. (Wurde für die Acetylierung weiterverwendet, vgl. Abschnitt 5.)

5. *1-(5'-O-Phosphoryl-3'-O-acetyl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon* (p*II*_a(Ac), **4**). Eine Lösung von 85 mg (0,23 mmol, Pyridinium-Salz) p*II*_a (**10**) in 2 ml abs. Pyridin wurde mit 1 ml (10 mmol) Essigsäureanhydrid 24 Std. bei 23° stehengelassen. Nach Hydrolyse des überschüssigen Reagens unter Eiskühlung mit 5 ml Wasser wurde die Lösung weitere 24 Std. bei 23° stehengelassen und dann 5mal mit je 15 ml Äther ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde i. V. eingengt und 3mal hintereinander lyophilisiert, bis ein trockenes Lyophilisat vorlag. Die Ausbeute an p*II*_a(Ac) (**4**) betrug 82,5 mg (88%). Das stark hygroskopische Präparat war im DC. (Fließmittel B, C, E und F) bis auf geringe Verunreinigungen einheitlich. – UV. (Wasser): 194,5 (17220), 225 (5780), 298 (6025) nm (ε). – IR. (KBr): u. a. Banden bei 1735 (C=O; Ester), 1655 cm⁻¹ (C=O; Pyridonring). – 90 MHz-¹H-NMR. (C₅D₅N): 8,39, *d*, 1H, H-C(6); 7,10, *m*, 2H, H-C(4) und H-C(1'); 6,56, *d*, 1H, H-C(3); 6,19, *t*, 1H, H-C(5); 5,72, *d*, 1H, H-C(3'); 4,71, *d* br., 2H, 2H-C(5'); 4,51, nicht aufgelöstes Signal, 1H, H-C(4'); 2,58, *m*, 2H, 2H-C(2'); 1,91, *s*, 3H, CH₃COO-C(3').

6. (MeOTr)*TapTapII*_a (**5**) aus (MeOTr)*TapTa* (**3**) und p*II*_a(Ac) (**4**). 24 mg (0,027 mmol, Pyridinium-Salz) (MeOTr)*TapTa* (**3**) und 42 mg (0,1 mmol, Pyridinium-Salz) p*II*_a(Ac) (**4**) wurden 3mal mit je 2 ml abs. Pyridin i. HV. getrocknet. Eine Lösung des Gemischs in 3 ml abs. Pyridin wurde mit 103 mg (0,5 mmol) DCC im Dunkeln bei 23° gerührt und der Reaktionsverlauf im DC. verfolgt. Nach 6 Tagen wurde mit 3 ml Wasser unter Eiskühlung hydrolysiert und während 24 Std. weitergerührt. Der Dicyclohexylharnstoff wurde über einer Fritte abgetrennt und mit 5 ml Pyridin/Wasser 1:1 gewaschen. Anschliessend wurde die mit Wasser auf 40 ml verdünnte klare Lösung zur weiteren Entfernung von Dicyclohexylharnstoff 3mal mit je 25 ml Äther extrahiert. Die organischen Extrakte wurden 2mal mit je 5 ml Wasser gewaschen, die vereinigten wässrigen Phasen unter Zusatz von Pyridin i. V. auf ca. 5 ml eingengt und mit 50 ml konz. Ammoniak-Lösung versetzt. Diese Lösung wurde 36 Std. bei 23° stehengelassen und dann i. V. eingengt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte auf einer DEAE-Sephadex-Säule (1 × 90 cm, Hydrogencarbonatform) in 2 Stufen: 1) Linearer Eluierungsgradient: Mischgefäss: 1 l H₂O, Vorratsgefäss: 1 l 0,1 M NH₄HCO₃; 2) Linearer Eluierungsgradient: Mischgefäss: 2,5 l 30% Äthanol, Vorratsgefäss: 2,5 l 0,25 M NH₄HCO₃ in 30% Äthanol; Fraktionengrösse: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient $\times M NH_4HCO_3$ $\times =$	OD.- λ (max)- Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf entsprechende Reaktanden ^{a)}	Substanz
60–69	0,075–0,085 in Wasser	42	8,3	(MeOTr) $T_{ap}T_d$ (3)
105–125	0,03–0,056 in 30proz. Äthanol	225	37,5	pII_d (10)
138–146	0,072–0,082 in 30proz. Äthanol	123	20,5	$II_d5'pp5'pII_d$
167–182	0,106–0,127 in 30proz. Äthanol	347	70	(MeOTr) $T_{ap}T_{ap}II_d$ (5)

^{a)} Spektroskopisch bestimmt.

Die vereinigten Fraktionen 167–182 wurden i. V. eingengt und das NH_4HCO_3 durch mehrfaches Abdampfen mit Methanol/Wasser 9:1 entfernt. Nach der Lyophilisation der wässrigen Lösung wurde (MeOTr) $T_{ap}T_{ap}II_d$ (5) in DC.-einheitlicher Form erhalten (Fließmittel B, C, E und F). – UV. (Wasser/Äthanol 1:1): 196 (107400), 225 (24270) (Schulter), 268 (18240), 301,5 (5140) (Schulter) nm (ϵ).

7. $T_{ap}T_{ap}II_d$ (11) aus (MeOTr) $T_{ap}T_{ap}II_d$ (5). Eine Lösung von 10,8 mg (0,0096 mmol, Ammonium-Salz) (MeOTr) $T_{ap}T_{ap}II_d$ in 3 ml abs. Pyridin wurde mit 7 ml Eisessig 50 Min. auf dem Dampfbad unter Ausschluss von Feuchtigkeit erhitzt. Nach Abkühlung des Gemisches wurde die Essigsäure i. HV. entfernt und 3mal zwischen je 40 ml Äther und je 10 ml Wasser ausgeschüttelt. Die ätherischen Phasen wurden 2mal mit 2 ml Wasser gewaschen. Da nach dem Eindampfen der vereinigten wässrigen Phasen noch der Geruch von Essigsäure festzustellen war, wurde die Lösung mit halb konz. Ammoniak-Lösung auf pH 9 eingestellt. Das dabei entstandene Ammoniumacetat wurde bei der Chromatographie des Rohproduktes an einer DEAE-Sephadex-Säule (1 \times 40 cm, Hydrogencarbonatform) abgetrennt. Linearer Eluierungsgradient: Mischgefäß: 1 l H_2O , Vorratsgefäß: 1 l 0,15M NH_4HCO_3 ; Fraktionengröße: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Das Trinucleosid-diphosphat **11** wurde in den Fraktionen 35–40, d.h. bei einer Konzentration von 0,06–0,07M NH_4HCO_3 eluiert. Nach Entfernen des NH_4HCO_3 durch wiederholtes Eindampfen mit Methanol/Wasser 9:1 und Lyophilisieren der wässrigen Lösung wurde $T_{ap}T_{ap}II_d$ (11) in einer Ausbeute von 7,4 mg (91%) erhalten. Das Präparat war im DC. in den Fließmitteln B, C, E und F einheitlich. – UV. (Wasser): 197 (29380), 210 (19230) (Schulter), 268 (17020), 302 (5035) (Schulter) nm (ϵ).

8. *Enzymatische Spaltungen. – Substratlösungen.* Die Durchführung der enzymatischen Spaltungen erfolgte nach [37].

Vom Ammonium-Salz von $T_{ap}T_{ap}II_d$ (11) wurde eine Lösung der Konzentration 0,02 μ mol/ μ l hergestellt. Sie enthielt 0,34 OD.₂₆₈-Einheiten pro μ l.

Enzymlösungen. 100 EU der Phosphodiesterase aus Schlangengift (E.C.3.1.4.1., Venom Phosphodiesterase I, *Crotalus adamanteus*, von *Worthington Biochemical Corporation*) wurde in 2 ml 0,33M Tris-Puffer, pH 9,1, gelöst.

13 EU Phosphodiesterase aus Milz (E.C.3.1.4.1., Phosphodiesterase II, *Bovine Spleen*, *P-L Biochemical Inc.*) wurden in 2 ml 0,2M Ammonium-Acetat-Puffer, pH 5,7, gelöst.

Spaltung mit Phosphodiesterase I. 30 μ l Substratlösung und 100 μ l Enzymlösung wurden zusammen 5 Std. bei 37° inkubiert. 10 μ l dieser Inkubationslösung wurden auf eine DC.-Platte aufgetragen und die vollständige Spaltung des Substrats überprüft. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgte in Fließmittel C.

Zur Bestimmung des Verhältnisses der bei der Enzymspaltung entstandenen Produkte wurden 50 μ l der Inkubationslösung durch Papierchromatographie (*Whatman* 3 MM) in Fließmittel C getrennt. Nach dem Trocknen des Chromatogramms wurden die UV.-aktiven Zonen in kleine Stückchen zerschnitten und während 10 Std. mit 2 ml 0,1N HCl extrahiert. Der Salzsäureextrakt wurde sodann über Watte in ein 5 ml Messkölbchen filtriert. Die Papierstückchen wurden noch 3mal mit je 1 ml 0,1N HCl gewaschen, sodass ein Totalvolumen von 5 ml erreicht wurde. Neben den Substrat-

flecken wurden jeweils auf gleicher Höhe im Papierchromatogramm blanke Zonen der gleichen Grösse ausgeschnitten und wie oben beschrieben behandelt. Die Lösungen dieser Zonen dienten bei der Messung der optischen Dichte der Spaltprodukte als Vergleichslösungen.

Substrat	Spaltprodukte	Verhältnis	
		theoret.	gefunden
$T_{ap}T_{ap}II_d$	T_d, pT_d, pII_d	1:1:1	1:1,04:1,08

Spaltung mit Phosphodiesterase II. 30 μ l Substratlösung und 50 μ l Enzymlösung wurden während 5 Std. bei 37° inkubiert. 6 μ l dieser Inkubationslösung wurden auf eine DC.-Platte aufgetragen und die vollständige Spaltung der Verbindung durch Entwicklung des Chromatogramms in Fließmittel C überprüft.

Die Bestimmung des Verhältnisses der bei der enzymatischen Spaltung entstandenen Produkte erfolgte gleich wie oben für die Spaltung mit Phosphodiesterase I beschrieben.

Substrat	Spaltprodukte	Verhältnis	
		theoret.	gefunden
$T_{ap}T_{ap}II_d$	T_{dp}, II_d	2:1	2:0,98

Tabelle 2. *Rf*-Werte

Substanz	Dünnschicht- chromatogramm Fließmittel						Papier- chromatogramm Fließmittel C
	A	B	C	D	E	F	
II_d (1)	0,60	0,58	0,67	0,17			0,73
$II_d(Ac)$ (7)	0,78	0,65	0,73	0,42			
(MeOTr) II_d (8)	0,75	0,80		0,54			
(MeOTr) $II_d(Ac)$ (9)				0,71			
pII_d (10)		0,22	0,19		0,65	0,40	0,23
$pII_d(Ac)$ (4)		0,30	0,27			0,44	
(MeOTr) $T_{ap}T_d$ (3)		0,50	0,65		0,82	0,61	
(MeOTr) $T_{ap}T_{ap}$ (6)		0,43	0,27				
(MeOTr) $T_{ap}T_dII_d$ (5)		0,44	0,54		0,80	0,58	
$T_{ap}T_{ap}II_d$ (11)		0,21	0,49			0,49	0,35
(MeOTr) $T_{ap}T_{ap}$		0,48	0,45				
(MeOTr) $T_{ap}T_{ap}$]							

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] N. Cerletti & Ch. Tamm, *Heterocycles* 5, 245 (1976).
- [2] 'Chemistry, Biology and Clinical Uses of Nucleoside Analogs', Ed. A. Bloch, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1975, 255; G. Wagner, *Die Pharmazie* 26, 377 (1971); T. Y. Shen, *Angew. Chem.* 82, 730 (1970); G. D. Diana & F. Pancic, *ibid.* 88, 458 (1976).
- [3] C. Temple, B. H. Smith, R. D. Elliott & J. A. Montgomery, *J. med. Chemistry* 16, 292 (1973); A. Bloch, G. Dutschman, B. L. Currie, R. K. Robins & M. J. Robins, *ibid.* 16, 294 (1973); H. Milne & L. B. Townsend, *ibid.* 17, 263 (1974); T. L. Chwang, W. F. Wood, J. R. Parkhurst, S. Nesnow, P. V. Danenberg & Ch. Heidelberger, *ibid.* 19, 643 (1976); J. T. Witkowski, R. K. Robins, R. W. Sidwell & L. N. Simon, *ibid.* 15, 1150 (1972); J. A. May & L. B. Townsend, *J. chem. Soc. (C)* 1975, 125; P. D. Cook, R. J. Rousseau, A. M. Mian, P. Dea, R. B. Meyer & R. K. Robins, *J. Amer. chem. Soc.* 98, 1492 (1976).
- [4] E. K. Hamamura, M. Przystasz, J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt, K. Yamaguchi, N. Uchida, K. Sato, A. Nomura, O. Shiratori, S. Takase & K. Katagiri, *J. med. Chemistry* 19, 654 (1976); *ibid.* 19, 663 (1976); *ibid.* 19, 667 (1976).

- [5] *H. Pischel & A. Holý*, Coll. czechoslov. chem. Commun. 35, 3584 (1970).
- [6] *A. Holý, R. W. Bald & F. Šorm*, *ibid.* 37, 592 (1972); *I. Votruba, A. Holý & H. Pischel*, *ibid.* 37, 2213 (1972); *V. Pačes & A. Holý*, *ibid.* 38, 1268 (1973); *J. Škoda, I. Votruba & J. Farkaš*, *ibid.* 39, 1500 (1974).
- [7] *A. Hampton, T. Sasaki & B. Paul*, J. Amer. chem. Soc. 95, 4404 (1973).
- [8] *W. J. Woodford, B. A. Swartz, C. J. Pillar, A. Kampf & M. P. Mertes*, J. med. Chemistry 17, 1027 (1974); *R. L. Barfknecht, R. A. Huet-Rose, A. Kampf & M. P. Mertes*, J. Amer. chem. Soc. 98, 5041 (1976).
- [9] *V. Kvita & G. Baschang*, Helv. 55, 2683 (1972); *F. W. Lichtenhaler & H. J. Müller*, Synthesis 1974, 199; *M. D. Edge, A. Hodgson, A. S. Jones, M. MacCoss & R. T. Walker*, J. chem. Soc. (C) 1973, 290; *M. J. Gait, A. S. Jones & R. T. Walker*, *ibid.* 1974, 1684; *F. Eckstein*, Angew. Chem. 87, 179 (1975); *F. Eckstein & R. S. Goody*, Biochemistry 15, 1685 (1976); *R. L. Letsinger, J. S. Wilkes & L. B. Dumas*, *ibid.* 15, 2810 (1976).
- [10] *N. Ototani & R. L. Whistler*, J. med. Chemistry 17, 535 (1974); *J. Hobbs, H. Sternbach, M. Sprinzl & F. Eckstein*, Biochemistry 12, 5138 (1973); *M. J. Robins & R. A. Jones*, J. org. Chemistry 39, 113 (1974); *R. Mengel & H. Wiedner*, Chem. Ber. 109, 433 (1976).
- [11] *A. Kornberg*, 'DNA-Synthesis', S. 67ff., W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1974.
- [12] *J. N. Davidson*, 'The Biochemistry of the Nucleic Acids', S. 339ff., Chapman and Hall, 1972.
- [13] *N. Cerletti*, Dissertation, Universität Basel, 1976.
- [14] *M. J. Bessman, J. R. Lehman, J. Adler, S. B. Zimmerman, E. S. Simms & A. Kornberg*, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 44, 633 (1958); *A. Kornberg*, 'Enzymatic Synthesis of DNA', John Wiley & Sons, N.Y., 1962; *A. G. Lezius & K.-H. Scheit*, Europ. J. Biochem. 3, 85 (1967).
- [15] *P. Kohler*, Dissertation, Universität Basel, 1974; *E. Volz, P. Kohler, U. Séquin & Ch. Tamm*, in L. B. Townsend & R. S. Tipson (Eds.) 'New or Improved Syntheses, Methods or Techniques in Nucleic Acid Chemistry', Wiley Interscience, im Druck.
- [16] *M. Ikehara, T. Nagura & E. Ohtsuka*, Chem. pharmazeut. Bull. 22, 123 (1974); *H. Schettlers, H. G. Gassen & H. Matthei*, Biochim. biophys. Acta 272, 549 (1972); *H. G. Gassen, U. Schwarz & R. Vormbrock*, Z. physiol. Chem. 355, 753 (1974).
- [17] *H. Pischel & A. Holý*, Coll. czechoslov. chem. Commun. 34, 89 (1969).
- [18] *R. Glaser, U. Séquin & Ch. Tamm*, Helv. 56, 654 (1973).
- [19] *I. Gregor, U. Séquin & Ch. Tamm*, Helv. 58, 712 (1975).
- [20] *F. Waldmeier*, Dissertation, Universität Basel, 1977.
- [21] *E. Volz & Ch. Tamm*, unveröffentlichte Versuche.
- [22] *U. Séquin & Ch. Tamm*, Helv. 55, 1196 (1972).
- [23] *H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 85, 3821 (1963).
- [24] *P. T. Gilham & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 80, 6212 (1958)
- [25] *H. Schaller & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc., 85, 3828 (1963).
- [26] *H. G. Khorana, K. L. Agarwal, H. Büchi, M. H. Caruthers, N. K. Gupta, K. Kleppe, A. Kumar, E. Ohtsuka, U. L. RajBhandary, J. H. van de Sande, V. Sgaramella, T. Terao, H. Weber & T. Yamada*, J. mol. Biol. 72, 209 (1972).
- [27] *H. G. Khorana, K. L. Agarwal, P. Besmer, H. Büchi, M. H. Caruthers, P. J. Cashion, M. Fridkin, E. Jay, K. Kleppe, R. Kleppe, A. Kumar, P. C. Loewen, R. C. Miller, K. Minamoto, A. Panet, U. L. RajBhandary, B. Ramamoorthy, T. Sekiya, T. Takeya & J. H. van de Sande*, J. biol. Chemistry 251, 565 (1976).
- [28] *G. Weimann & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 84, 4329 (1962); *R. I. Zhdanov, S. M. Zhenodarova*, Synthesis 1975, 222; *D. G. Knorre & V. F. Zarytova*, Nucl. Acids Res. 3, 2709 (1976).
- [29] *G. Weimann & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 84, 419 (1962).
- [30] *F. Eckstein & K.-H. Scheit*, Angew. Chem. 79, 317 (1967).
- [31] *M. Yoshikawa, T. Kato & T. Takenishi*, Bull. chem. Soc. Jap. 42, 3505 (1969).
- [32] *T. M. Jacob & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 87, 368 (1965).
- [33] *W. Falk & Ch. Tamm*, Helv. 55, 1928 (1972).
- [34] *H. Kössel, H. Büchi & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 89, 2185 (1967).
- [35] *G. M. Tener*, J. Amer. chem. Soc. 83, 159 (1961).
- [36] *S. A. Narang, T. M. Jacob & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 87, 2988 (1965); *H. Schott & H. Kössel*, *ibid.* 95, 3778 (1973); *H. Köster & W. Kaiser*, Liebigs Ann. Chem. 1974, 336.
- [37] *U. Séquin*, Helv. 57, 68 (1974).