

244. Nucleoside und Nucleotide, Teil 12
Synthese von Dinucleosidmonophosphaten mit
1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidon als Baustein¹⁾

von Ernst Volz und Christoph Tamm

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

(21.VII.78)

Nucleosides and Nucleotides. Part 12

Synthesis of Dinucleoside Monophosphates Containing 1-(2'-Deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidone

Summary

The connexion of the modified nucleoside 1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidone (M_d , **2**) with the natural nucleotides pT_d and pG_d is described. The protected dinucleoside monophosphates $(MeOTr)M_dpT_d$ (**6**) and $(MeOTr)M_dpG_d^{ib}$ (**9**) were prepared by the standard phosphodiester method using DCC as condensing agent. M_dpT_d (**7**) was obtained by treatment of **6** with formic acid/methanol 7:3 at 0°. **9** was converted to the free dinucleoside monophosphate M_dpG_d (**11**) by removing the *N*-isobutyryl- and *p*-methoxytrityl protecting group on consecutive treatment with 0.04 N CH_3ONa in CH_3OH and $HCOOH/CH_3OH$ 7:3 at 0° respectively. Enzymatic degradation of the free dinucleoside monophosphates **7** and **11** yielded the corresponding nucleosides and nucleotides in the correct ratios.

1. Einleitung. - Nucleinsäuren, die unnatürliche Bausteine enthalten, haben sich als wichtige Hilfsmittel bei der Untersuchung der Wirkungsweise und Spezifität von Enzymen des Nucleotidmetabolismus erwiesen [2] [3]. Modifikationen der hochmolekularen Struktur der DNA und RNA lassen sich durch den enzymatischen Einbau von Nucleotidanalogen [2] [4] oder durch die Einwirkung von mutagenen Substanzen [3] [5] erzielen. Eine weitere Möglichkeit bietet die chemische Synthese von DNA-Matrizen, die an einer definierten Stelle ein unnatürliches Nucleotid enthalten [6]. Voraussetzung für die Herstellung solcher modifizierter Polynucleotide ist die Kenntnis der Eigenschaften entsprechender Dinucleosidmonophosphate bzw. Dinucleotide.

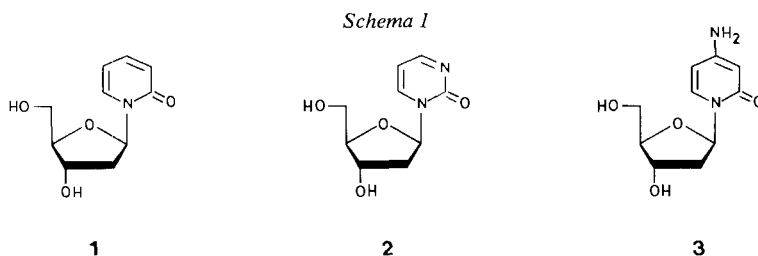
Die Nucleoside 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon (M_d , **1**) [7] [8], 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidon (M_d , **2**) [9-11] und 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-4-amino-2(1*H*)-pyridon (2'-Desoxy-3-desazacytidin, Z_d , **3**) [12] [13] haben aufgrund der veränderten Struktur der Base die Fähigkeit zur Ausbil-

¹⁾ Teil 11 s. [1].

dung von Wasserstoffbrücken zu natürlichen Nucleosiden teilweise verloren und sind deshalb, wie auch die entsprechenden Ribonucleoside *I*, *M* und *Z*, für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen von besonderem Interesse [13-16].

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die DNA- bzw. RNA-Polymerasenspezifität haben wir die Desoxyribonucleoside *I*_d, *M*_d und *Z*_d sowie deren Mono- und Triphosphate synthetisiert [7] [9] [13]. Ferner wurde die Verwendbarkeit von *I*_d für die Oligonucleotidsynthese eingehend untersucht [1] [17-20].

Aufgrund der aussergewöhnlichen Säure- und Basenlabilität von *M*_d [10] [15] [21] war es zunächst fraglich, ob diese Verbindung unter den üblichen Bedingungen der Oligonucleotidsynthese stabil sei. Deshalb synthetisierten wir die Dinucleosidmonophosphate *M*_dp*T*_d (**7**) und *M*_dp*G*_d (**11**) sowie die entsprechend geschützten Derivate, wobei wir die derzeit gebräuchlichsten Schutzgruppen verwendeten: Monomethoxytrityl für die 5'-Hydroxygruppe in *M*_d, Acetyl für die 3'-Hydroxygruppe in p*T*_d und Isobutyryl für die Amino- und 3'-Hydroxygruppe in p*G*_d. Die Herstellung der Produkte erfolgte nach der herkömmlichen Diester-Methode [22], wobei sich wegen der Labilität von *M*_d modifizierte Verfahren zur Schutzgruppenentfernung als nötig erwiesen.



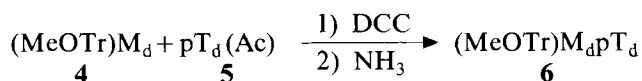
2. Synthese von (MeOTr)*M*_d (4**).** - *M*_d [9] wurde mit 1,3 Äquivalenten Monomethoxytritylchlorid in abs. Pyridin bei Raumtemperatur umgesetzt und das Reaktionsgemisch nach vierzehn Stunden zur Methanolyse des überschüssigen Monomethoxytritylchlorids mit Methanol versetzt. Nach Abtrennung der tritylhaltigen Produkte durch Extraktion mit Methylchlorid aus einer wässrigen Lösung erfolgte die Reinigung des Rohprodukts auf einer Kieselsäule, wobei zur Eluierung Methylchlorid und steigende Mengen Methanol dienen. Fällung aus Pentan bei 0° ergab dünn-schichtchromatographisch reines (MeOTr)*M*_d (**4**) in einer Ausbeute von 82%.



Das UV.-Spektrum von **4** in Äthanol/Wasser 1:1 zeigte ein Absorptionsmaximum bei 306 nm ($\epsilon = 5740$) (vgl. $\epsilon = 5700$ für das ungeschützte **2**), das vom 2(1*H*)-Pyrimidon-Chromophor der Molekel stammt, sowie eine für die Monomethoxytri-

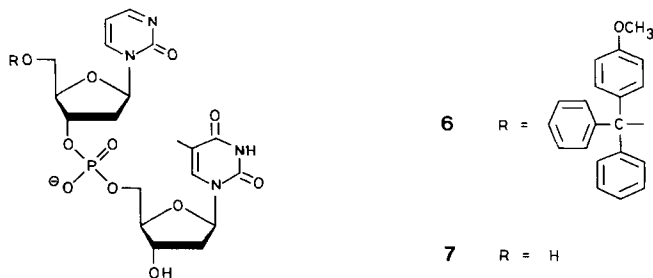
tyl-Gruppe charakteristische Schulter bei 230 nm ($\epsilon = 14\,100$). Im IR.-Spektrum wurden neben den bekannten Banden von M_d (vgl. [9]) typische Banden der Monomethoxytritylgruppe bei 1605, 1510 und 1445 cm^{-1} gefunden. Die Elementaranalyse bestätigte die Summenformel von **4**. Das Präparat zeigte nach Besprühen der entwickelten Dünnschichtchromatogramme mit 10proz. Perchlorsäure und anschliessendem Erwärmen eine für die Anwesenheit der Monomethoxytrityl-Gruppe und den Zuckerbestandteil charakteristische Gelb- bzw. Schwarzfärbung auf.

3. Synthese von $(MeOTr)M_d pT_d$ (6**).** - Zur Herstellung des geschützten Dinucleosidmonophosphats $(MeOTr)M_d pT_d$ (**6**) wurde das tritylierte Nucleosid $(MeOTr)M_d$ (**4**) und das acetylierte Nucleotid $pT_d(Ac)$ (**5**; vgl. [23]) mit einem 10fachen Überschuss an DCC in abs. Pyridin während 6-7 Tagen umgesetzt. Da **5** sehr leicht zugänglich ist, konnte es in einem 3fachen Überschuss bezüglich **4** eingesetzt werden, wodurch sich bei der Kondensation eine erhöhte Ausbeute erzielen liess. Das überschüssige DCC wurde mit Wasser hydrolysiert, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgetrennt und das Rohprodukt zur Abspaltung der 3'-O-Acetylgruppe während 23 Stunden mit Pyridin/konz. Ammoniak 1:2 behandelt. Die Entfernung von pT_d gelang durch Verteilung zwischen Wasser und Butanol. In der wässrigen Phase konnte pT_d , in der organischen Phase $(MeOTr)M_d pT_d$ (**6**), $(MeOTr)M_d$ (**4**) sowie tritylhaltige Nebenprodukte nachgewiesen werden. Nach Trennung der tritylhaltigen Verbindungen mittels präparativer Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel resultierte reines **6** in einer Ausbeute von 40%.

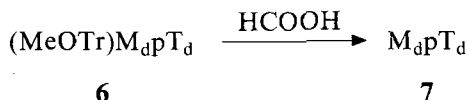


Das UV.-Spektrum von **6** in Methanol zeigte Absorptionsmaxima bei 309 nm ($\epsilon = 5080$) und bei 266 nm ($\epsilon = 12\,530$), was einer Überlagerung der Spektren von **4** und pT_d entspricht. Die Monomethoxytritylgruppe und die Zuckerbestandteile der Verbindung wurden im Dünnschichtchromatogramm wie im Kap. 2 beschrieben nachgewiesen. Abspaltung der Monomethoxytritylgruppe von **6** (s. unten) und anschliessende enzymatische Spaltung des freien Dinucleosidmonophosphats $M_d pT_d$ (**7**; vgl. exper. Teil) bewiesen die korrekte Verknüpfung der Einzelbestandteile **4** und pT_d in $(MeOTr)M_d pT_d$ (**6**).

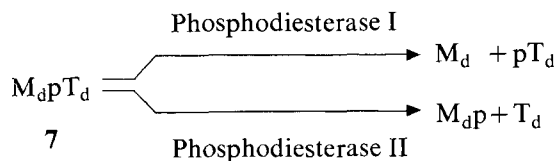
Schema 2



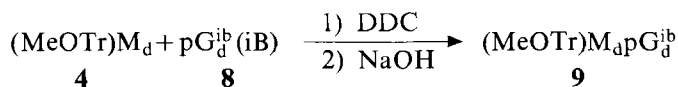
4. Synthese von $M_d p T_d$ (7). - Enttritylierungsversuche mit $(MeOTr)M_d$ (4) und $(MeOTr)M_d p T_d$ (6) hatten gezeigt, dass die Anwendung verschiedener bekannter Verfahren, wie z. B. die Behandlung der geschützten Verbindungen mit 80proz. wässriger Essigsäure [22] [24] oder 70proz. Essigsäure in Pyridin [18-20] meist zur quantitativen Spaltung der sehr labilen glykosidischen Bindung in M_d führten. Auch die Entfernung der Schutzgruppen war unbefriedigend²⁾. Eine rasche Enttritylierung von M_d -Derivaten mit minimaler Glykosidspaltung konnte durch Behandlung des Dinucleosidmonophosphates **6** mit 70proz. Ameisensäure in Methanol (s. exper. Teil) erreicht werden. Neben dem auf diese Weise in 77% Ausbeute entstandenen $M_d p T_d$ (7) wurden noch 8% nicht umgesetztes **6** zurückgewonnen.



Das UV.-Spektrum von **7** in Wasser wies Absorptionsmaxima bei 302 nm ($\epsilon = 4510$), 268 nm ($\epsilon = 9120$) und bei 210 nm ($\epsilon = 16300$) auf, was einer Kombination der beiden Chromophore von M_d und $p T_d$ entspricht. Ein Beweis für die Abwesenheit der Monomethoxytritylgruppe in **7** ist die fehlende Gelbfärbung beim Besprühen der Dünnschichtchromatogramme mit 10proz. Perchlorsäure und anschließendem Erwärmen. Die weitere Charakterisierung erfolgte durch enzymatische Spaltungen mit Phosphodiesterase I und Phosphodiesterase II (vgl. exper. Teil), wobei die Spaltprodukte M_d und $p T_d$ bzw. $M_d p$ und T_d in den erwarteten Verhältnissen zueinander nachgewiesen werden konnten.



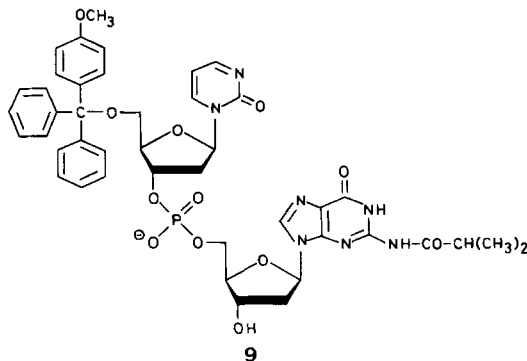
5. Synthese von $(MeOTr)M_d p G_d^{ib}$ (9). - Die Kondensation zum vollständig geschützten Dinucleosidphosphat $(MeOTr)M_d p G_d^{ib}$ (iB) erfolgte analog des im Kap. 3 beschriebenen Verfahrens. Als Schutzgruppe für die 3'-Hydroxy- und Aminofunktion der Nucleotidkomponente $p G_d$ wurde die bewährte Isobutyrylgruppe gewählt (vgl. [26]). Die 3'-O-Isobutyrylgruppe von $(MeOTr)M_d p G_d^{ib}$ (iB) liess sich durch selektive alkalische Hydrolyse bei 0° mit 1N NaOH in Gegenwart von 25% Pyridin während 20 Minuten abspalten. Nach Neutralisation der Reaktionslösung ergab präparative Dünnschichtchromatographie des Rohprodukts auf Kieselgel reines **9** in einer Ausbeute von 40%.



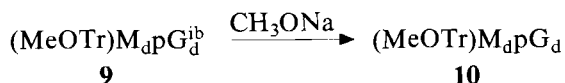
²⁾ Für Einzelheiten s. [25].

Im UV.-Spektrum in Methanol zeigte **9** charakteristische Absorptionsmaxima bei 280 nm ($\epsilon = 13\,680$), bei 257 nm ($\epsilon = 15\,850$) und bei 233 nm ($\epsilon = 16\,410$) sowie eine Schulter bei 309 nm ($\epsilon = 7\,315$). Die weitere Charakterisierung erfolgte nach Entfernung der Schutzgruppen durch enzymatische Spaltung (s. unten).

Schema 3

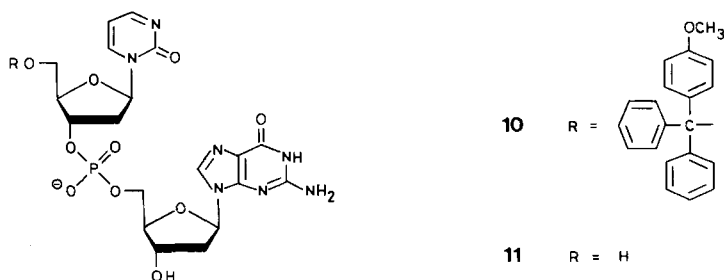


6. Synthese von (MeOTr) M_d pG $_d$ (10**).** - Die Entfernung von *N*-Acyl-Schutzgruppen bei der Oligonucleotidsynthese erfolgt im allgemeinen mit konz. Ammoniak [22] bzw. mit konz. Ammoniak/Pyridin [1] [19] während 2-3 Tagen. Unter diesen Bedingungen zersetzten sich die M_d -Derivate weitgehend. Als optimal für die Entfernung der Schutzgruppen und für die Stabilität von M_d erwies sich die Behandlung von **9** mit 0,04-0,05 N CH_3ONa in CH_3OH während 14 Stunden bei 23°. Nach Aufarbeitung resultierte dünnschichtchromatographisch reines **10** in einer Ausbeute von 95%.



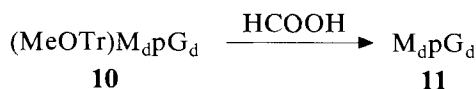
Eine nach Abspaltung der *N*-Isobutyrylgruppe von Guanosinderivaten charakteristische hypsochrome Verschiebung der UV.-Maxima sowie die Abnahme der Extinktionskoeffizienten bei diesen Maxima deuteten auf die Abwesenheit der Aminoschutzgruppe in **10** hin. Das erhaltene UV.-Spektrum von **10** in Äthanol/Wasser 1:1 zeigte Maxima bei 305 nm ($\epsilon = 4\,800$) und bei 235 nm ($\epsilon = 15\,850$) sowie Schultern bei 271 nm ($\epsilon = 7\,760$) und bei 250 nm ($\epsilon = 13\,680$). Dies entspricht einer Überla-

Schema 4

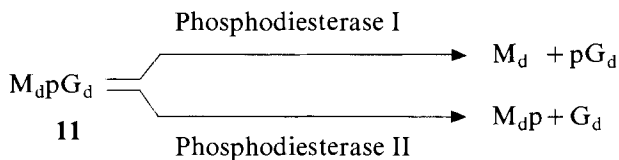


gerung der Spektren von $(\text{MeOTr})\text{M}_d$ (**4**) und pG_d . Die weitere Charakterisierung erfolgte nach Enttritylierung von **10** durch Spaltung des erhaltenen Produkts **11** mit Phosphodiesterase I und II (vgl. Kap. 7).

7. Synthese von M_dpG_d (11**).** - Die Monomethoxytritylgruppe in $(\text{MeOTr})\text{M}_d\text{pG}_d$ (**10**) wurde nach dem im Kap. 4 beschriebenen Verfahren entfernt. Bei der Chromatographie fielen neben 51% freiem Dinucleosidphosphat M_dpG_d (**11**) etwa 8% einer weiteren Substanz an, die im UV.-Spektrum verglichen mit **11** bei 302 nm keine Absorption mehr zeigte und ein durch Abspaltung der Pyrimidonbase aus **11** entstandenes Produkt darstellt. Durch nochmaliges Chromatographieren der Mischfraktionen an DEAE-Sephadex liess sich eine weitere Menge des Nebenprodukts von **11** abtrennen. Die gesamte Ausbeute an **11** betrug 69%. Der Anteil von nicht umgesetztem $(\text{MeOTr})\text{M}_d\text{pG}_d$ (**10**), das von der Säule eluiert wurde, betrug 19% des eingesetzten Materials.



Das UV.-Spektrum von **11** entspricht einer Überlagerung der Spektren von M_d und pG_d . Es wies in Wasser ein Maximum bei 252 nm ($\epsilon = 12\,105$) sowie Schultern bei 302 nm ($\epsilon = 4635$) und bei 269 nm ($\epsilon = 9120$) auf. Die vollständige Spaltung von **11** mit Phosphodiesterase I und Phosphodiesterase II zu M_d und pG_d bzw. M_dp und G_d (vgl. exper. Teil) ist ein weiterer Beweis für die Konstitution von **11**.



8. Schlussbemerkungen. - Die erzielten Ergebnisse lieferten wichtige Hinweise auf die Stabilität und Reaktivität des unnatürlichen Nucleosids M_d unter den Bedingungen der Oligonucleotidsynthese. So liess sich M_d mit natürlichen Nucleotiden nach der Diester-Methode zwar verknüpfen, die Abspaltung der Monomethoxy- und Aminoschutzgruppen wegen der aussergewöhnlichen Säure- und Basenlabilität von **2** aber nicht nach den üblichen Verfahren vollziehen. Die Einführung neuer bzw. die Modifizierung bekannter Verfahren erlaubte es jedoch, die genannten Schutzgruppen schonend zu entfernen.

Die beschriebenen Verbindungen wurden chromatographisch (s. Tab. 2, exper. Teil), UV.-spektroskopisch und mit Hilfe enzymatischer Spaltungen (s. Tab. 1, exper. Teil) charakterisiert. Die freien Dinucleosidphosphate **7** und **11** verhielten sich gegenüber Phosphodiesterase I und Phosphodiesterase II wie natürliche Substrate und liessen sich somit vollständig zu den entsprechenden Nucleosiden und Nucleotiden abbauen.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekte Nr. 2.435.0.75 und 2.629.0.76) für die gewährte Unterstützung.

Experimenteller Teil

1. Allgemeines, s. [20]. - Abweichungen oder Ergänzungen dazu: Die IR.-Spektren wurden mit einem Beckmann-IR.-Spektrophotometer, Modell IR8, aufgenommen. - Fließmittelsysteme für die Chromatographie (v/v): A) 2-Propanol/konz. Ammoniak-Lösung/Wasser 7:1:2; B) 1-Propanol/konz. Ammoniak-Lösung/Wasser 6:1:3; C) Butanol/Eisessig/Wasser 5:2:3; D) Chloroform/Methanol 1:1; E) Methylenchlorid/Methanol 9:1.

1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidon (M_d , **2**) wurde nach [9] hergestellt. Kristallisation aus Äthanol/Aceton/Äther ergab **2** in farblosen Nadeln vom Smp. 136-138°. - UV. (Methanol): 308 (5700) nm (ϵ) (vgl. [9]).

3'-O-Acetylthymidin-5'-phosphat (pT_d (Ac), **5**) wurde durch Acetylierung von pT_d mit Essigsäureanhydrid nach [23] hergestellt und war mit einer Referenzprobe identisch. - UV. (Methanol): 262 (9650) nm (ϵ) (vgl. [23]).

N^2 -Isobutryl-3'-O-isobutryl-2'-desoxyguanosin-5'-phosphat (pG_d^i (iB), **8**) wurde nach [26] durch Umsetzung von pG_d mit Isobuttersäureanhydrid in Pyridin hergestellt. - UV. (Äthanol): 255, 280 nm; $\epsilon_{255}/\epsilon_{280} = 1,55$, $\epsilon_{260}/\epsilon_{280} = 1,48$, $\epsilon_{300}/\epsilon_{280} = 0,53$.

2. 1-(5'-O-Monomethoxytrityl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidon ((MeOTr) M_d , **4)**. - Eine Mischung von 300 mg (1,414 mmol) M_d (**2**) und 590 mg (1,91 mmol) Monomethoxytritylchlorid wurde 48 Std. i.HV. über Kaliumhydroxid und Phosphorpentoxid getrocknet und anschliessend in 16 ml abs. Pyridin gelöst. Das Gemisch wurde 14 Std. im Dunkeln bei 23° stehengelassen, anschliessend zur Methanololyse des überschüssigen Monomethoxytritylchlorids mit 4,5 ml Methanol versetzt und weitere 2 Std. bei 23° stehengelassen. Nach Eindampfen der Lösung wurde der Rückstand in 100 ml Methylenchlorid gelöst, 3mal mit 60 ml Wasser extrahiert und die wässrigen Phasen mit 60 ml Methylenchlorid zurückgewaschen. Die organischen Phasen, die das geschützte Nucleosid **4** enthielten, wurden mit Natriumsulfat getrocknet und über Magnesiumsulfat filtriert. Nach Entfernung von restlichem Pyridin durch Eindampfen des Filtrats und wiederholtes Einengen mit abs. Benzol erfolgte die Reinigung des Rohprodukts auf einer Kieselgelsäule (250 g SiO_2) mit CH_2Cl_2/CH_3OH . Es wurden Fraktionen zu je 200 ml gesammelt. Bei einem Gehalt von 4% Methanol wurde das geschützte Nucleosid **4** eluiert. Fällung aus Pentan bei 0°, anschliessende Trocknung im Stickstoffstrom und i.HV. ergab (MeOTr) M_d (**4**) als farbloses Pulver vom Smp. 89-91°. Die Ausbeute des DC.-einheitlichen (A, B, C, E) Präparats betrug 56,3 mg (82%). - UV. (Äthanol/Wasser 1:1): 306 (5740), 230 (14100) Sch. nm (ϵ). - IR. (KBr): u. a. Banden bei 3380 (HO-C(3')), 1650 (C=O; Pyrimidonring), 1605, 1510, 1445 cm^{-1} (Phenyl).

$C_{29}H_{28}N_2O_5$ (484,5) Ber. C 71,88 H 5,83 N 5,78% Gef. C 71,92 H 5,81 N 5,67%

3. 1-(5'-O-Monomethoxytrityl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidon-(3'-5')-thymidin ((MeOTr) $M_d pT_d$, **6)**. - Zu einer Lösung von 154,6 mg (0,319 mmol; 1832 OD₃₀₉-Einheiten³) (MeOTr) M_d (**4**) und 430 mg (0,969 mmol; 9310 OD₂₆₂) pT_d (Ac) (**5**) in 8 ml abs. Pyridin wurden 618 mg (3 mmol) DCC hinzugefügt. Das Gemisch wurde 7 Tage bei 23° im Dunkeln gerührt und anschliessend bei 0° mit 6 ml Wasser hydrolysiert. Nach 24 Std. Stehenlassen bei 23° wurde vom farblosen Rückstand (Dicyclohexylharnstoff) abfiltriert und mit 30 ml 50proz. Pyridin gewaschen. Das Filtrat wurde unter Zusatz von Pyridin eingengt, der Rückstand in 45 ml Pyridin und 90 ml konz. Ammoniak gelöst und 23 Std. bei 23° stehengelassen. Die Lösung wurde auf ca. 10 ml eingengt, mit 50 ml Wasser verdünnt, anschliessend 3mal mit je 50 ml Butanol extrahiert und die organischen Phasen mit 4 ml Wasser zurückgewaschen. In den wässrigen Phasen befand sich das freie Nucleotid pT_d , während in den Butanolphasen das geschützte Dinucleosidphosphat **6**, (MeOTr) M_d und nicht identifizierte Nebenprodukte gefunden wurden. Nach Eindampfen der organischen Phasen wurde das Rohprodukt von **6** mittels präp. DC. im Fließmittel D gereinigt (Plattengrösse 10 \times 20 cm, Laufstrecke ca. 9,5 cm). Auf einer Platte liessen sich ca. 10 mg Rohprodukt, das aus einer Lösung von Methanol/Pyridin 10:1 auf die Platten aufgetragen wurde, reinigen. Die im UV.-Licht sichtbaren Produktzonen wurden von den Platten abgekratzt, das Kieselgel pulverisiert und anschliessend mit 350 ml Methanol/Pyridin 4:1 eluiert. Nach Abdampfen der Lösungsmittel und Lyophilisieren des Rückstands aus Wasser resultierten 111,4 mg (MeOTr) $M_d pT_d$ (**6**) (40,2%) in Form farbloser, DC.-einheitlicher (A, B, C, D) Flocken. - UV. (Methanol) 309 (5080), 266 (12530), 230 (18710) Sch. nm (ϵ).

³) 1 OD-Einheit ist die Menge Substanz, die in 1 ml Lösung in einer 1 cm-Zelle eine Absorption von 1,0 ergibt.

4. 1-(3'-O-Phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidon-(3'-5')-thymidin ($M_{dp}T_d$, 7). - Es wurden 11,7 mg (0,013 mmol; 68 OD₃₀₂) (MeOTr) $M_{dp}T_d$ (6) mit 1 ml auf 0° gekühlter 70proz. Ameisensäure in Methanol versetzt und 4 Min. unter Eiskühlung stehengelassen (die Lösung färbte sich schwach gelb). Hierauf wurde das Gemisch i.HV. eingedampft, wobei sich die Gelbfärbung vorübergehend intensivierte. Nach Abdampfen mit Äthanol und Wasser i.HV. wurde der Rückstand in 20 ml Wasser aufgenommen, 2mal mit 12 ml Äther/Petroläther 8:2 ausgeschüttelt und die organischen Phasen 2mal mit je 4 ml Wasser zurückgewaschen. Die wässrigen Phasen wurden eingengt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (40×1 cm, Hydrogencarbonatform) aufgetragen. Linearer Eluierungsgradient: Mischgefäss: 2 l Wasser; Vorratsgefäss: 2 l 0,03M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 24,5 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,63 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient (NH ₄ HCO ₃)	Substanz	OD ₃₀₂ -Einheiten	Ausbeute in % ^{a)}
45-50	0,008-0,009M	$M_{dp}T_d$ (7)	45	77
69-77	0,013-0,014M	(MeOTr) $M_{dp}T_d$ (6)	5	8

^{a)} Spektroskopisch bestimmt.

Die Fraktionen 45-50 wurden vereinigt, eingedampft und zur Entfernung von NH₄HCO₃ noch mehrmals mit Wasser eingedampft. Lyophilisieren aus Wasser ergab 5,3 mg des DC.-einheitlichen (A, B, C) Ammonium-Salzes von 7 in farblosen Flocken. - UV. (Wasser): 302 (4510), 268 (9120), 210 (16300) nm (ϵ).

5. 1-(5'-O-Monomethoxytrityl)-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidon-(3'-5')-N²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin ((MeOTr) $M_{dp}G_d^b$, 9). - Das Gemisch aus 93,5 mg (0,193 mmol; 1108 OD₃₀₉) (MeOTr) M_d (4) und 134 mg (0,236 mmol; 3940 OD₂₅₇) pG_d^b(iB) (8) wurden 4mal durch Abdampfen mit je 5 ml abs. Pyridin i.HV. getrocknet und anschliessend 30 Min. bei 0,05 Torr nachgetrocknet. Das Gemisch wurde in 2 ml abs. Pyridin aufgenommen, mit einer Lösung von 648 mg (3,147 mmol) DCC in 2 ml abs. Pyridin versetzt, 7 Tage im Dunkeln bei 23° gerührt und anschliessend unter Eiskühlung mit 8 ml Wasser tropfenweise versetzt. Nach 14 Std. Stehenlassen bei 23° wurde vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und mit 50proz. Pyridin nachgewaschen. Das Filtrat wurde unter Pyridinzusatz eingedampft, der Rückstand in 25 ml auf 0° gekühltes 50proz. Pyridin aufgenommen und unter Eiskühlung mit 25 ml 2N NaOH (0°) versetzt. Eine Inhomogenität des Gemisches konnte weitgehend durch Zugabe von 7 ml Wasser beseitigt werden. Nach 20 Min. bei 0° wurde die Lösung mit 90 ml Pyridinium-Dowex-50 neutralisiert, der Ionenaustauscher über einer Säule abfiltriert und anschliessend mit 250 ml Pyridin/Wasser 1:1 gewaschen. Filtrat und Eluat wurden vereinigt, unter Pyridinzusatz eingedampft und der Rückstand in Methanol/Pyridin 4:1 aufgenommen. Die Reinigung des Rohprodukts von 9, das neben pG_d^b noch (MeOTr) M_d (4) sowie Spuren unpolarer Nebenprodukte enthielt, erfolgte mittels präp. DC. im Fließmittel D (vgl. Kap. 3), wobei zur Eluierung des Kieselgels 200 ml Pyridin/Äthanol 1:4 verwendet wurde. Nach Eindampfen der Lösung unter Pyridinzusatz und Lyophilisieren des Rückstands aus 10proz. wässrigem Pyridin resultierten 74,6 mg DC.-einheitliches (A, B, C, D) (MeOTr) $M_{dp}G_d^b$ (9) als farbloser Schaum in einer Ausbeute von 40%. - UV. (Methanol): 280 (13680), 257 (15850), 233 (16410), 309 (7315) Sch. nm (ϵ).

6. 1-(5'-O-Monomethoxytrityl)-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidon-(3'-5')-2'-desoxyguanosin ((MeOTr) $M_{dp}G_d$, 10). - Eine Lösung von 30,6 mg (0,032 mmol; 504 OD₂₅₇) (MeOTr) $M_{dp}G_d^b$ (9) in 11,5 ml abs. Methanol wurde mit 11,5 ml 0,082N CH₃ONa in CH₃OH versetzt und 14 Std. bei 23° im Dunkeln stehengelassen. Nach Neutralisation mit 35 ml Pyridinium-Dowex-50 (wässrige Aufschlämmung) bei 0° wurde der Ionenaustauscher über einer Säule abfiltriert und anschliessend mit 200 ml 50proz. wässrigem Pyridin eluiert. Filtrat und Eluat wurden vereinigt, unter Zusatz von Pyridin auf ca. 1 ml eingengt und mit 15 ml Wasser verdünnt. Die wässrige Lösung wurde 5mal mit je 30 ml Äther extrahiert und die organischen Phasen 3mal mit je 15 ml Wasser gewaschen. Nach Einengen der wässrigen Phasen unter Pyridinzusatz ergab Lyophilisieren des Rückstands aus 25proz. wässrigem Pyridin 26,9 mg (95%) DC.-einheitliches (A, B, C, D) (MeOTr) $M_{dp}G_d$ (10) in Form von farblosen Flocken. - UV. (Äthanol/Wasser 1:1): 305 (4800), 235 (15850), 271 (7760) Sch., 250 (13680) Sch. nm (ϵ).

7. 1-(3'-O-Phosphoryl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidon-(3'-5')-2'-desoxyguanosin (M_dpG_d, **11).** - Es wurden 28,6 mg (0,032 mmol; 154 OD₃₀₂) (MeOTr)M_dpG_d (**10**) 2 Min. bei 0° mit 0,9 ml Ameisensäure/Methanol 7:3 umgesetzt. Die weitere Aufarbeitung des Gemisches erfolgte wie in Kap. 4. Das Rohprodukt wurde an einer DEAE-Sephadex-Säule (90×1 cm; Hydrogencarbonatform) gereinigt: Linearer Eluierungsgradient: Mischgefäß: 2 l Wasser; Vorratsgefäß: 2 l 0,03M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 24 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,6 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient (NH ₄ HCO ₃)	Substanz	OD ₃₀₂ -Einheiten	Ausbeute in % ^{a)}
97-101	0,017-0,018M	M _d pG _d (11)	75	50,6
102-108	0,018-0,019M	M _d pG _d (11) + d-RibpG _d	28	18,8
153-167	0,027-0,03M	(MeOTr)M _d pG _d (10)	29	19

^{a)} Spektroskopisch bestimmt.

Die Fraktionen 97-101 wurden vereinigt, i.V. eingedampft und zur Entfernung von NH₄HCO₃ mehrmals mit Methanol/Wasser 1:1 eingedampft. Nach Lyophilisieren aus wässriger Lösung liessen sich 9 mg des DC.-einheitlichen (A, B, C) Ammoniumsalzes von **11** als farbloser Schaum isolieren. - UV. (Wasser): 252 (12105), 302 (4635) Sch., 269 (9120) Sch. nm (ε).

8. Enzymatische Spaltungen. - Die Herstellung der Enzym- und Substratlösungen, die Durchführung der Versuche und die Trennung der Spaltprodukte erfolgte nach [20] und [27].

Tabelle 1. *Enzymatische Spaltungen*

Enzym	Substrat	Spaltprodukte	Verhältnis der Spaltprodukte
Phosphodiesterase I	M _d pT _d	M _d , pT _d	1:1,09
	M _d pG _d	M _d , pG _d	1:1,05
Phosphodiesterase II	M _d pT _d	M _d p, T _d	1:0,99
	M _d pG _d	M _d p, G _d	1:0,94

Tabelle 2. *Rf-Werte*

Substanz	Dünnschichtchromatogramme					Papierchromatogramme Fließmittel A
	Fließmittel					
	A	B	C	D	E	
M _d (2)	0,58	0,59	0,45		0,09	0,63
(MeOTr)M _d (4)	0,77	0,68	0,66		0,41	
M _d p						0,13
T _d						0,63
pT _d	0,19	0,36	0,32			0,11
pT _d (Ac) (5)	0,22		0,43			
G _d						0,39
pG _d	0,11	0,30	0,16			0,06
pG _d ^{ip} (iB) (8)	0,26	0,50	0,50			
(MeOTr)M _d pT _d (6)	0,61	0,58	0,53	0,44		
M _d pT _d (7)	0,44	0,48	0,24			
(MeOTr)M _d pG _d ^{ip} (iB)	0,68	0,62	0,57			
(MeOTr)M _d pG _d ^{ip} (9)	0,53	0,62		0,38		
(MeOTr)M _d pG _d (10)	0,50	0,59	0,54	0,36		
M _d pG _d (11)	0,41	0,47	0,16			

Enzyme: Verwendet wurden: Phosphodiesterase aus Schlangengift (E.C. 3.1.4.1., Venom Phosphodiesterase I, *Crotalus adamanteus*, *Worthington Biochemical Corporation*) und Phosphodiesterase aus Milz (E.C. 3.1.4.1., Phosphodiesterase II, Bovine Spleen, *PL Biochemical Inc.*).

Spaltung mit Phosphodiesterase I. Die Dinucleosidmonophosphate $M_d p T_d$ (7) und $M_d p G_d$ (11) wurden zu M_d und $p T_d$ bzw. M_d und $p G_d$ gespalten.

Spaltung mit Phosphodiesterase II. $M_d p T_d$ und $M_d p G_d$ wurden jeweils zu $M_d p$ und T_d bzw. $M_d p$ und G_d gespalten.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *F. Waldmeier & Ch. Tamm*, *Helv.* 61, 1648 (1978).
- [2] *F. Cramer*, *Acc. chem. Res.* 2, 338 (1969); *A. G. Lezius & K. H. Scheit*, *Europ. J. Biochemistry* 3, 85 (1967).
- [3] *P. J. Abbott & R. Saffhill*, *Nucl. Acids Res.* 4, 761 (1977).
- [4] *R. L. Letsinger, J. S. Wilkes & L. B. Dumas*, *Biochemistry* 15, 2810 (1976).
- [4] *R. C. Wilhelm & D. B. Ludlum*, *Science* 153, 1403 (1966); *D. B. Ludlum, R. C. Warner & A. J. Wahba*, *Science* 145, 397 (1964); *J. N. Davidson*, *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, Chapman and Hall, London 1972, S. 273; *R. Knippers*, *Molekulare Genetik*, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1974, S. 64.
- [6] *N. Cerletti*, Dissertation, Basel 1976.
- [7] *U. Séquin & Ch. Tamm*, *Helv.* 52, 1219 (1969).
- [8] *M. P. Mertes*, *J. med. Chemistry* 13, 149 (1970).
- [9] *P. Kohler*, Dissertation, Basel 1974.
- [10] *S. G. Laland & G. Serck-Hanssen*, *Biochem. J.* 90, 76 (1964); *R. Wightman & A. Holý*, *Coll. Czechoslov. chem. Commun.* 38, 1381 (1973).
- [11] *T. B. Øyen, L. Helgeland & S. Laland*, *Biochem. J.* 92, 27 (1964); *D. Cech & A. Holý*, *Coll. Czechoslov. chem. Commun.* 42, 2246 (1977).
- [12] *B. L. Currie, R. K. Robins & M. J. Robins*, *J. heterocycl. Chemistry* 7, 323 (1970).
- [13] *M. Wachtl & Ch. Tamm*, unveröffentlichte Versuche.
- [14] *I. Votruba, A. Holý & H. Pischel*, *Coll. Czechoslov. chem. Commun.* 37, 2213 (1972); *V. Pačes & A. Holý*, *ibid.* 38, 1268 (1973); *A. Holý & I. Votruba*, *ibid.* 39, 1646 (1974).
- [15] *T. B. Øyen*, *Biochim. biophys. Acta* 186, 237 (1969).
- [16] *A. Bloch, G. Dutschman, B. L. Currie, R. K. Robins & M. J. Robins*, *J. med. Chemistry* 16, 294 (1973).
- [17] *U. Séquin & Ch. Tamm*, *Helv.* 55, 1196 (1972).
- [18] *I. Gregor, U. Séquin & Ch. Tamm*, *Helv.* 58, 712 (1975).
- [19] *N. Cerletti & Ch. Tamm*, *Heterocycles* 5, 245 (1976).
- [20] *N. Cerletti & Ch. Tamm*, *Helv.* 60, 1182 (1977).
- [21] *V. Uchytílová, A. Holý, D. Cech & J. Gut*, *Coll. Czechoslov. chem. Commun.* 40, 2347 (1975).
- [22] *H. Weber & H. G. Khorana*, *J. mol. Biol.* 72, 219 (1972).
- [23] *P. T. Gilham & H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 6212 (1958).
- [24] *H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch & H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 3821 (1963).
- [25] *E. Volz*, Dissertation, Basel 1977.
- [26] *H. Büchi & H. G. Khorana*, *J. mol. Biol.* 72, 251 (1972).
- [27] *U. Séquin*, *Helv.* 57, 68 (1974).