

120. Nucleotide. X.¹⁾ Synthese und Eigenschaften von Dinucleosidmonophosphaten mit 2'-Desoxyadenosin und 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-lumazinen als Bausteine

von Ramamurthy Charubala und Wolfgang Pfeleiderer

Fachbereich Chemie der Universität Konstanz, Postfach 7733, D-7750 Konstanz

(29.XII.78)

Nucleotides. X. Synthesis and properties of dinucleoside monophosphates with 2'-deoxyadenosine and 1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-lumazines as building blocks

Summary

The synthesis of various dinucleoside monophosphates **16-20** consisting of 2'-deoxyadenosine and 1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-lumazines *via* the triester approach is described. The fully protected phosphotriesters **6-10** as well as the partially deblocked intermediates **11-15** have also been isolated and characterized by physical means. Intramolecular interactions in **16-20** have been investigated by the determination of the hypochromicities and CD. spectra revealing a more or less distinct stacking effect in dependence of the 6,7-substituents in the lumazine moiety as well as the polarity of the internucleotidic linkage. Enzymatic degradations of the dinucleoside monophosphates with snake venom and spleen phosphodiesterase are depending strongly on various structural features indicating a much lower substrate specificity especially in presence of 6,7-diphenyl-lumazine as an aglycone with the latter enzyme.

1. Einleitung. - Das Vorkommen modifizierter Nucleoside in verschiedenen t-RNA [2] hat in jüngster Zeit ein steigendes Interesse speziell an solchen Nucleosid- und Nucleotid-Derivaten geweckt, deren strukturelle Veränderungen am Phosphat-, Zucker- und Basenteil neuartige Nucleinsäurebausteine mit vielfältigen biologischen Aktivitäten und potentieller medizinischer Anwendung [3] darstellen. Derartige Strukturanaloga können wertvolle Dienste bei der Aufklärung enzymatischer Wirkungsmechanismen leisten, einen tieferen Einblick in die H-Brückenkontrollierten Wechselwirkungen nach dem *Watson-Crick*- [4] bzw. *Hoogsteen*-Prinzip [5] vermitteln oder zum besseren Verständnis der Nahbeziehungen von Proteinen mit Polynucleotiden [6] beitragen.

Die Tatsache, dass sich Hydroxy- und Aminopteridine durch eine ungewöhnliche Schwerlöslichkeit [7] auszeichnen, die auf besonders starken intermolekularen H-Brückenbindungen beruhen dürfte, hat uns veranlasst, mit den von uns auf syn-

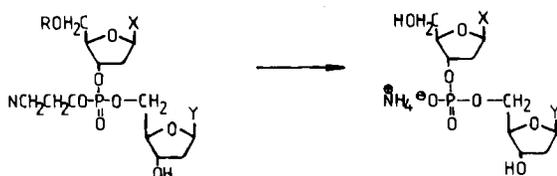
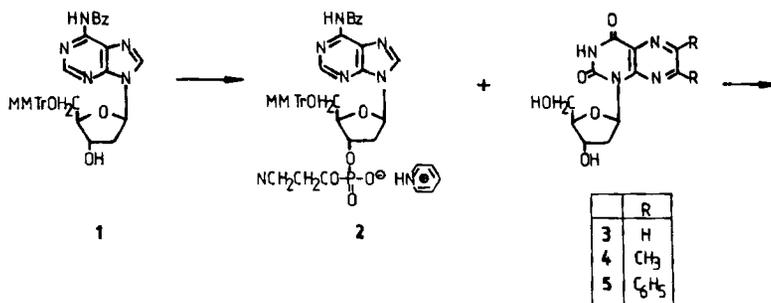
¹⁾ Teil 9: [1].

thetischem Wege zugänglich gemachten Lumazinnucleosiden [8] im Rahmen eines breit angelegten Programmes über Oligonucleotid-Synthesen als einfachste Modelle zunächst verschiedene gemischte Dinucleosidmonophosphate mit Pteridinen als Aglykonen aufzubauen und ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften zu untersuchen.

Für den stufenweisen Aufbau der Internucleotid-Bindungen [9] stehen dabei prinzipiell zwei Möglichkeiten offen, die vielfältig modifiziert wurden und von denen sich neben der von *Khorana* [10] entwickelten Phosphodiester- in neuerer Zeit die Phosphotriester-Methode [11-64] in den Vordergrund geschoben hat. Die Vorteile des letzteren Synthesepinzips, die in der leichteren Handhabung, Isolierung und chromatographischen Reinigung der neutralen Phosphotriester offenbart sind, veranlassten uns, die Herstellung der gewünschten Substanzen nach diesem Verfahren in Angriff zu nehmen. Für die Blockierung der verschiedenen Funktionen wurden bewährte Schutzgruppen der Nucleosid-Nucleotidchemie verwendet, und zwar *p*-Methoxytrityl- [65] für die 5'-Hydroxy-Gruppe, Benzoyl für die Amino-Gruppe [65] und β -Cyanoäthyl für den Phosphorsäurerest [66]. Als Kondensationsmittel für die Knüpfung der Internucleotid-Bindung haben sich 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfochlorid (TPS) [67] und *p*-Tosyltriazolid [68] am besten bewährt.

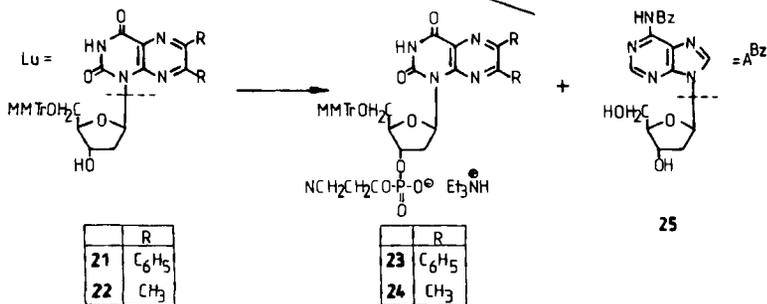
2. Syntheseweg. - Ausgehend vom *N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-(*p*-monomethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin (**1**) [65] wurde zunächst mit β -Cyanoäthylphosphat in Pyridin in der Weise zum 3'-(β -Cyanoäthyl)phosphat (**2**) phosphoryliert, dass nach einer Stunde Aktivierung des Phosphorylierungsmittels mittels 2 Äquiv. TPS $\frac{1}{2}$ Äquiv. Nucleosid zugesetzt und 18-24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Hydrolyse mit Eiswasser wurde mit Chloroform extrahiert und die organische Phase durch mehrfaches Eindampfen mit wasserfreiem Pyridin im Rotavapor so weit absolutiert, dass der Diester **2** direkt im selben Lösungsmittel durch weiteres TPS aktiviert und somit für die Kondensation mit der zweiten Nucleosid-Komponente vorbereitet werden kann. Nach 30 Min. ist dieser Prozess beendet, und es wird das 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-lumazin (**3**) bzw. sein 6,7-Dimethyl-(**4**) und 6,7-Diphenyl-Derivat (**5**) in völlig ungeschützter Form zugegeben und in 1-2 Tagen zu den gewünschten Triestern **6-8** kondensiert. Die Aufarbeitung gestaltete sich recht einfach, denn nach Hydrolyse in Eiswasser kann das Reaktionsprodukt leicht mit Chloroform extrahiert und so von verschiedenen Nebenprodukten abgetrennt werden. Da das DC. verständlicherweise nicht völlig einheitlich war und durch die Verwendung ungeschützter Lumazin-2'-desoxynucleoside neben der Hauptreaktion, der (3'→5')-Verknüpfung, mit der Bildung kleiner Mengen an (3'→3')-Dinucleosidphosphattriestern gerechnet werden musste, wurde der Reaktionsextrakt zusätzlich einer Monomethoxytritylierung in abs. Pyridin unterworfen, um auf diese Weise durch Einführung des Monomethoxytrityl-Restes in die 5'-Stellung des (3'→3')-Isomeren dessen chromatographische Eigenschaften so stark zu verändern, dass eine eindeutige Separierung vom gewünschten (3'→5')-Triester an Kieselgel möglich wird. Durch präparative Schichtchromatographie kann dieses Ziel dann ohne Schwierigkeit erreicht werden, und nach Eluierung der sauber separierten Hauptzone lassen sich die Phosphotriester **6, 7** und **8** in chromatographisch reiner Form durch Lyophilisieren in Ausbeuten von 17, 30 und 32% gewinnen.

Schema



	X	Y	R
6	Bz	Lu	MMTr
7	Bz	Lu _{CH₃}	MMTr
8	Bz	Lu _{C₆H₅}	MMTr
9	Lu _{C₆H₅}	Az	MMTr
10	Lu _{CH₃}	Lu _{CH₃}	MMTr
11	Bz	Lu	H
12	Az	Lu _{CH₃}	H
13	Az	Lu _{C₆H₅}	H
14	Lu _{C₆H₅}	Az	H
15	Lu _{CH₃}	Lu _{CH₃}	H

	X	Y
16	A	Lu _{CH₃}
17	A	Lu _{CH₃}
18	A	Lu _{C₆H₅}
19	Lu _{C₆H₅}	A
20	Lu _{CH₃}	Lu _{CH₃}



Bei der entsprechenden Synthese des zu **8** isomeren (5'→3')-Triesters **9** stellten wir fest, dass die kombinierten Reaktionen ausgehend vom 6,7-Diphenyl-1-(5'-*O-p*-monomethoxytrityl-2'-desoxy- β -**D**-ribofuranosyl)-lumazins (**21**), dessen Phosphorylierung und anschliessende Kondensation mit *N*⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosin (**25**) nur eine 6proz. Ausbeute an **9** lieferte. Wesentlich günstiger gestaltet sich das Resultat, wenn **21** mit β -Cyanoäthylphosphat und TPS in Pyridin zunächst zum Cyanoäthylphosphorsäurediester **23** phosphoryliert und dieser in Form seines Triäthylammoniumsalzes in Substanz (65%) isoliert wird. Für die nachfolgende Kondensation mit **25** wurde mehrfach mit abs. Pyridin eingedampft und dann in diesem Lösungsmittel nach Aktivierung mit TPS mit der zweiten Nucleosidkomponente 2 Tage bei Raumtemperatur kondensiert, wodurch **9** in einer Ausbeute von 36% erhalten wurde.

Im Rahmen der Herstellung des Lumazylyl-(3'→5')-lumazin-triesters **10** erwies sich als Kondensationsmittel sowohl für die Phosphorylierung des 6,7-Dimethyl-1-(5'-*O-p*-monomethoxytrityl-2'-desoxy- β -**D**-ribofuranosyl)-lumazins (**22**) mit Cyanoäthylphosphat zu **24** als auch die Weiterreaktion mit 6,7-Dimethyl-1-(2'-desoxy- β -**D**-ribofuranosyl)-lumazin (**4**) zu **10** das *p*-Tosyltriazolid [68] als sehr vorteilhaft und ergab eine Ausbeute von 55% an Dipteridin-monophosphatriester.

Der Abspaltung der Schutzgruppen lag dann ein Zweistufen-Prozess zugrunde, bei dem zunächst in 80proz. Essigsäure bei Raumtemperatur detrityliert und die resultierenden Triester **11-15** durch präparative Kieselgelchromatographie in Ausbeuten von 70-90% isoliert wurden. Im letzten Schritt erfolgte die Eliminierung der Cyanoäthyl-Funktion sowie die Verseifung der *N*-Benzoyl-Gruppe mittels konz. Ammoniak-Lösung in Dioxan und lieferte direkt die Ammoniumsalze der verschiedenen Dinucleosidmonophosphate **16-20** in chromatographisch reiner Form und Ausbeuten von 80-90%.

3. Physikalische Eigenschaften. - *Chromatographie.* Für die Prüfung der verschiedenen Reaktionsprodukte auf Reinheit und Einheitlichkeit dienten die üblichen chromatographischen Methoden, bei denen sich infolge der empfindlichen Eigenfluoreszenz der Pteridinteile in der Molekel der Nachweis sehr einfach und überaus effektiv gestaltete. Mögliche Verunreinigungen und Nebenprodukte liessen sich damit leicht erkennen und auf präparativ chromatographischem Wege abtrennen. Die freien Dinucleosid-monophosphate **16-20** wurden neben der chromatographischen Charakterisierung auf Cellulose zusätzlich der Dünnschicht-elektrophorese in Borat-Puffer pH 9 unterworfen und damit die Einheitlichkeit der Substanzen, die sich aufgrund der bekannten Schwierigkeiten elementaranalytisch nicht eindeutig bestimmen lassen, weiter gesichert.

UV.-Spektren. Die strukturelle Charakterisierung der verschiedenen Verbindungen basiert in erster Linie auf UV.-spektrophotometrischen Daten (*Tab. 1*), die in Methanol bzw. bei verschiedenen pH-Werten bestimmt wurden. Die Extinktionen sind auf den Phosphatgehalt bezogen, der sich nach der Methode von *Fiske-Subba Row* [69] sehr genau ermitteln lässt.

Beim Vergleich der UV.-Spektren der freien Dinucleosidmonophosphate **16-20** mit den Ausgangs-Lumazindesoxyribosiden **3-5** [8] im langwelligen Bereich, der durch den Adeninchromophor nicht verfälscht ist, fällt auf, dass einmal die Extink-

Tabelle 1. Physikalische Daten von Dinucleosid-monophosphaten

	UV.-Absorptionsspektren		log ε	pH		DC.	Cellulose		Elektro- reseb) CD.-Cel- lulose Borat pH 9
	λ _{max} (nm) ^{a)}			A	C		Kie- selgel A	B	
d-MMTrA _{Bz} p(ce)Lu	(6) 231	278	318	4,61	4,33	3,89	MeOH	0,17	
d-MMTrA _{Bz} p(ce)Lu ^{m2}	(7) 230	280	325	4,66	4,43	3,95	MeOH	0,32	
d-MMTrA _{Bz} p(ce)Lu ^{phc2}	(8) 228	278	361	4,66	4,49	4,07	MeOH	0,44	
d-MMTrLu ^{phc2} p(ce)A _{Bz}	(9) 228	278	360	4,76	4,59	4,11	MeOH	0,40	
d-MMTrLu ^{m2} p(ce)Lu ^{m2}	(10) 234	256	325	4,65	4,70	4,19	MeOH	0,33	
d-A _{Bz} p(ce)Lu	(11) 233	282	317	4,40	4,29	3,83	MeOH	0,13	
d-A _{Bz} p(ce)Lu ^{m2}	(12) 231	277	324	4,38	[4,29]	3,91	MeOH	0,23	
d-A _{Bz} p(ce)Lu ^{phc2}	(13) 225	264	361	4,58	4,42	4,07	MeOH	0,28	
d-Lu ^{phc2} p(ce)A _{Bz}	(14) 228	274	358	4,54	4,41	4,06	MeOH	0,26	
d-Lu ^{m2} p(ce)Lu ^{m2}	(15) 232	[248]	325	4,14	[4,23]	4,14	MeOH	0,19	0,50
d-ApLu	(16) [232]	246	318	[4,20]	4,25	3,82	1,0	0,15	0,35
	[233]	244	318	[4,20]	4,12	3,77	7,0		
		[258]	328	[4,17]	4,17	3,82	13,0		
d-ApLu ^{m2}	(17) 248	248	327	4,28	4,28	3,89	1,0	0,22	0,43
		248	328	4,29	4,29	3,88	7,0		
		[265]	333	4,36	[4,10]	3,93	13,0	0,47	0,57
d-ApLu ^{phc2}	(18) [230]	258	366	[4,49]	4,42	4,13	1,0	0,39	0,39
	227	260	367	4,43	4,35	4,07	7,0		
		358	366	4,51	4,18	4,18	13,0		
d-Lu ^{phc2} pA	(19) [230]	260	363	[4,41]	4,36	4,09	1,0	0,46	0,56
	228	261	363	4,39	4,37	4,09	7,0		
		261	363	4,45	4,45	4,13	13,0		
d-Lu ^{m2} pLu ^{m2}	(20) [230]	[245]	323	[4,34]	[4,27]	4,21	1,0	0,11	0,30
	[230]	[245]	323	[4,35]	[4,28]	4,22	7,0		
		240	329	4,47	3,82	4,24	13,0	0,16	0,46
d-Lu	(3) 228	275	315	4,11	3,60	3,86	3,0	0,30	0,46
		237	323		4,16	3,86	11,0		
d-Lu ^{m2}	(4) [245]	277	323	[3,87]	3,97	4,00	3,0	0,41	0,53
	240	270	330	4,20	3,47	4,00	11,0	0,26	
d-Lu ^{phc2}	(5) 222	274	360	4,40	4,16	4,11	3,0	0,33	0,81
	[220]	266	360	[4,38]	4,29	4,19	11,0	0,78	

a) Zahlen in eckigen Klammern bedeuten eine Schulter.

b) Bezogen auf pT = 1,0.

tionen der langwelligen Banden erniedrigt sind und dass zum anderen auch ihre Bandenlage im Gegensatz zu der Mehrzahl natürlicher Purin- und Pyrimidin-Dinucleosidphosphate [70] und mit Ausnahme von **20** eine nicht unbedeutende bathochrome Verschiebung erfahren hat. Besonders deutlich sind die Effekte beim Dinucleosidmonophosphat-Paar **18** und **19** im Vergleich zu **5** sichtbar (Fig. 1), die auf eine intramolekulare Wechselwirkung, einen «Stacking-Effekt», zurückzuführen sind, denn die entsprechenden Spektren der Lumazin-N₁-2'-desoxyriboside und ihrer 3'-Mono- [1] bzw. 5'-Monophosphate [71] weisen diese Unterschiede nicht auf.

Hypochromizitäten. Um quantitative Aussagen über die gegenseitige Beeinflussung der Aglykone in den Dinucleosidmonophosphaten machen zu können, haben wir die Hypochromizitäten sowohl durch vollständige enzymatische Spaltung mit einem Überschuss an Schlangengift-Phosphodiesterase als auch auf der Basis einer Phosphatbestimmung auf spektrophotometrischem Wege ermittelt. Es wurde hierzu bei 37° in Puffer pH 8,92 inkubiert, bis sich chromatographisch kein Ausgangsprodukt mehr nachweisen liess, und dann wurden die Extinktionen bei pH 7 gemessen.

Die gefundenen Werte lassen eine interessante, strukturbedingte Tendenz dergestalt erkennen, dass einmal die d(ApLu)-Kombinationen im Vergleich zum natürlichen dApT-analogen [72] beträchtlich höhere Hypochromizitäten besitzen und sich zum anderen auch ein relevanter Effekt in Abhängigkeit von den Substituenten in 6- und 7-Stellung des Lumazinaglykons abzeichnet. Ausgehend von **16** bewirken Donatorsubstituenten wie Methylgruppen eine Verstärkung der Wechselwirkung zwischen dem π -Elektronen-Mangelsystem Lumazin und dem π -Elek-

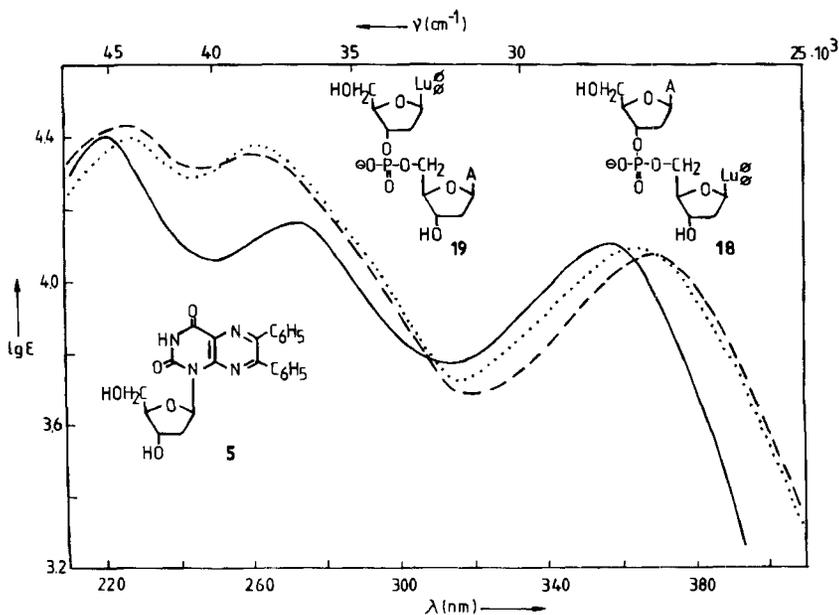


Fig. 1. UV.-Absorptionsspektren von **18** (pH 7) (-----), **19** (pH 7) (.....), und **5** (pH 3) (—)

Tabelle 2. Hypochromizitäten in Dinucleosidmonophosphaten

Verbindung	% Hypochromizität, pH 7,0		Wellenlängen- Verschiebung λ_{\max} (nm)	
	enzymatisch	Phosphat- bestimmung	Dimer	Monomer
d-ApLu (16)	16	17	318 →	315
d-ApLu ^{m2} (17)	19,6	19,8	328 →	323
d-ApLu ^{phe2} (18)	8	8	367 →	360
d-Lu ^{phe2} pA (19)	4,4	4,4	363 →	360
d-Lu ^{m2} pLu ^{m2} (20)	14	14	323 →	324
d-ApT	4,8			
d-TpA	2,4			

tronen-Überschußsystem Adenin, was sich in einer Erhöhung der Hypochromizität bei **17** kundtut, während Phenylsubstituenten (**18**) vermutlich infolge sterischer Hinderung das Gegenteil bewirken. Ferner fällt auf, dass sich das Paar d(ApLu) (**18**) und d(LupA) (**19**) in ihren Hypochromizitäten analog dem Paar d(ApT) und d(TpA) [72] signifikant unterscheiden, wofür unserer Ansicht nach die sterisch bedingte bessere Stapelung des elektronendefizienten Pyrazinteils im Lumazinaglykon mit dem elektronenreichen Imidazolring des Adenins in **18** mit der (3' → 5')-Verknüpfung gegenüber der (5' → 3')-Verknüpfung in **19** verantwortlich sein dürfte. Eine entsprechende Korrelation weisen auch die langwelligen Lumazinbanden in **18** und **19** auf, die mit zunehmender Hypochromizität in den Dinucleosidmonophosphaten verstärkt bathochrom verschoben sind.

Eine Besonderheit in der hier untersuchten Reihe stellt das Dinucleosidmonophosphat des 6,7-Dimethylumazins (**20**) dar, das als strukturelles Analogon des TpT angesehen werden kann, aber entgegen diesem, das nur einen sehr schwachen Stacking-Effekt zeigt [37], eine Hypochromizität von 14% aufweist. Ferner scheint charakteristisch zu sein, dass Wechselwirkungen zwischen gleichartigen Aglykonen sich in keiner bathochromen, sondern vielmehr schwachen hypochromen Verschiebung der langwelligen UV.-Bande äussern. Auch gilt für **20** nicht die Feststellung, dass gleichartige effektive Ladungen infolge elektrostatischer Abstossung einer stapelnden Wechselwirkung entgegenwirken [70], denn das Dianion von **20** besitzt bei pH 13 immer noch 13% Hypochromizität. Es muss weiteren Untersuchungen an verschiedenartigen Dipteridinnucleosidmonophosphaten vorbehalten bleiben, die Allgemeingültigkeit dieser Effekte zu untermauern und mit bestimmten Strukturbildern in Einklang zu bringen.

CD.-Spektren. Einen weiteren Einblick in die Feinstruktur der verschiedenen Dinucleosidphosphate **16-20** versprechen wir uns zunächst von den CD.-Spektren, die bei pH 7 aufgenommen wurden (Tab. 3).

Ein Vergleich der Spektren von **16** und **17** lässt sehr ähnliche Kurvenverläufe erkennen, die sich im langwelligen (> 300 nm) sowie kurzwelligen Bereich (< 250 nm) stark an die Kurven der monomeren Lumazin-Bausteine **3** und **4** anlehnen, die ihrerseits wiederum fast identisch sind mit den Spektren der entsprechenden 3'- und 5'-Monophosphate. Im Zwischenbereich kommt natürlich der Einfluss des Adenosin-Teils auf das Spektrum zum Ausdruck, wobei auffällt, dass

Tabelle 3. CD.-Spektren von Lumazin-Nucleotiden und

Verbindung	λ_{\max} (nm)						
d-Lu (3)	220	240	250	260		315	
d-Lup	222	240	255	263		315	
d-pLu	220	239	253	262		315	
d-Lu ^{m2} (4)	215	240	255	265		315	
d-Lu ^{m2} p	220	240	255	265		317	
d-pLu ^{m2}	215	240	258	263		320	
d-APLu (16)	215	240		265	294	315	
d-APLu ^{m2} (17)	212	242		265	287	325	
d-Lu ^{phe2} (5)	215	230	245		283		355
d-Lu ^{phe2} p	216	230	244		282		360
d-pLu ^{phe2}	220	230	244		281		367
d-APLu ^{phe2} (18)		235		250	280	330	368
d-Lu ^{phe2} pA (19)	220	230	240	257	280	[315]	365
d-Lu ^{m2} pLu ^{m2} (20)	215	240	260	270	279	305	340

relativ hohe Elliptizitäten auftreten, wie man sie sonst nur bei starren, strukturell fixierten Adenosin-Derivaten kennt.

Eine stärkere Abweichung von den monomeren Grundspektren tritt auf, wenn das 6,7-Diphenyllumazin als Aglykon vorhanden ist, wie dies im Dinucleosidmonophosphat-Paar **18** und **19**, das sich sogar durch entgegengesetzt gerichtete Cotton-Effekte der langwelligen Übergänge auszeichnet, zum Ausdruck kommt. Die Tat-

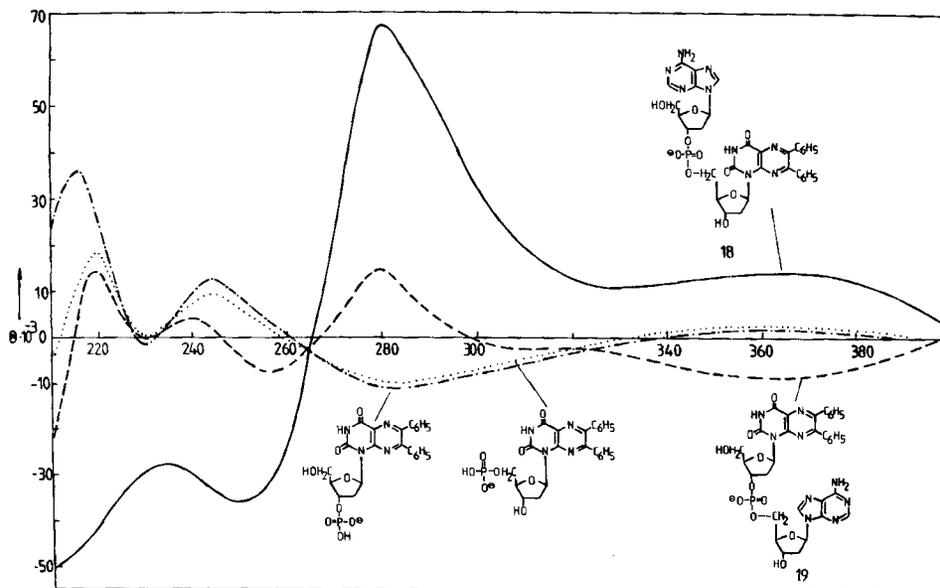


Fig.2. CD.-Spektren von **18** (—), **19** (---), 5-3'-monophosphat (-·-·-) und 5-5'-monophosphat (·····) bei pH 7

Dinucleosid-monophosphaten bei pH 7

Verbindung		⊖					
d-Lu	(3)	+ 18000	- 10100	- 1575	- 2850		+ 8500
d-Lup		+ 20100	- 9800	- 1000	- 2300		+ 7000
d-pLu		+ 17000	- 11650	- 2100	- 2850		+ 6150
d-Lu ^{m2}	(4)	+ 33400	- 12800	- 1600	- 3000		+ 7560
d-Lu ^{m2} p		+ 35000	- 15000	- 2000	- 3500		+ 5950
d-pLu ^{m2}		+ 30700	- 18900	- 2000	- 2400		+ 6600
d-ApLu	(16)	+ 37600	- 23000		+ 17600	- 4400	+ 6620
d-ApLu ^{m2}	(17)	+ 50500	- 41200		+ 41700	+ 5040	+ 8200
d-Lu ^{phe2}	(5)	+ 32750	- 3800	+ 11350		- 6900	+ 3150
d-Lu ^{phe2} p		+ 36200	- 2050	+ 12450		- 11000	+ 1200
d-pLu ^{phe2}		+ 18400	± 0	+ 9800		- 9950	+ 2400
d-ApLu ^{phe2}	(18)		- 27500		- 35400	+ 67000	+ 11000 + 14200
d-Lu ^{phe2} pA	(19)	+ 14350	± 0	+ 4400	- 7650	+ 14500	[- 2200] - 8800
d-Lu ^{m2} pLu ^{m2}	(20)	+ 88300	- 35000	+ 4000	- 1250	- 900	- 5300 + 16400

sache, dass **16** und **17**, die die grössten Hypochromizitäten zeigen, sich jedoch wenig vom zugrundeliegenden Lumazin-nucleosid bzw. -nucleotid in den CD.-Spektren unterscheiden, muss so verstanden werden, dass zwischen der Basen-Wechselwirkung und der Hypochromizität eine relativ strenge Beziehung gilt, während eine entsprechende Relation beim Circular dichroismus insofern nicht zwingend gilt, als hier die konformativen Änderungen im Molekelaufbau die bestimmenden Primäreffekte darstellen. Man darf sogar aus den beobachteten, abweichenden Kurvenverläufen von **18** und **19** (Fig. 2) schliessen, dass mit dem Einbau des 6,7-Diphenyl-lumazins in Dinucleosidmonophosphate eine starke Konformationsänderung hervorgerufen wird, die ihre Ursache in der grösseren Raumerfüllung durch die sperrigen Phenylgruppen haben dürfte.

20 schliesslich fällt auch hier aus dem üblichen Rahmen, als es für den langwelligen Übergang einen Doppel-Cotton-Effekt zeigt, der dann in Erscheinung treten kann, wenn benachbarte gleiche Aglykone vorhanden sind [73]. Die Korrelation zum langwelligen UV.-Maximum ist hier somit nicht durch die Lage des ersten CD.-Piks, sondern vielmehr dem ersten Wendepunkt der CD.-Kurve gegeben und zeigt die erwartete gute Übereinstimmung.

4. Enzymatische Spaltungen. - Die Dinucleosidmonophosphate **16-20** wurden anschliessend noch der Einwirkung von Schlangengift- und Milzphosphodiesterase unterworfen, um Aufschluss über die enzymatische Spaltungsbereitschaft der Internucleotid-Bindung in diesen modifizierten unnatürlichen Nucleinsäurebausteinen zu geben. Generell kann festgehalten werden, dass die Schlangengift-Phosphodiesterase gegenüber den Pteridin-modifizierten Dinucleosidmonophosphaten weit weniger spezifisch reagiert als das entsprechende Enzym aus Milz. Da die enzymatischen Spaltungen jedoch in allen Fällen langsamer verlaufen als die der entsprechenden natürlichen Pyrimidin- und Purinnucleotid-Analogen, wurden die Inkubationszeiten bei 37° auf 6 bzw. 24 Std. ausgedehnt und nach diesen Intervallen die prozentuale Spaltung spektrophotometrisch ermittelt. Mit Schlangengiftphosphodi-

Tabelle 4. *Enzymatische Spaltung der Dinucleosidmonophosphate 16-20 mit Schlangengift- und Milz-Phosphodiesterase*

		Schlangengift-PDE		Milz-PDE	
		% Spaltung nach		% Spaltung nach	
		6 Std.	24 Std.	6 Std.	24 Std.
d- <i>ApLu</i>	(16)	86	100	78	100
d- <i>ApLu</i> ^{m2}	(17)	54	100	53	100
d- <i>ApLu</i> ^{phe2}	(18)	37	67	40	77
d- <i>Lu</i> ^{phe2} pA	(19)	97	100	1	1
d- <i>Lu</i> ^{m2} p <i>Lu</i> ^{m2}	(20)	66	100	4	25

esterase sind nach 1 Tag mit Ausnahme von **18** alle Dinucleosidmonophosphate quantitativ gespalten, wobei aus den Werten nach 6 Std. zu erkennen ist, dass die Gegenwart eines Purinnucleotid-Bausteines am 3'-Ende eine beträchtlich bessere Substratspezifität signalisiert.

Die Milz-Phosphodiesterase spricht bei diesen Untersuchungen stärker auf strukturelle Abweichungen vom natürlichen Bautyp an, so dass aus dieser Reihe nur die Dinucleosidmonophosphate **16-18**, die am 5'-Ende den Adenosin-Teil tragen, einen hohen Spaltungsprozentsatz nach 24 Std. aufweisen. Ein Lumazin-Baustein in dieser Stellung setzt der enzymatischen Spaltung grossen Widerstand entgegen, wobei das Vorliegen des 6,7-Diphenyllumazins als Aglykon den grössten Hemmeffekt bewirkt. Letzteres Aglykon bewirkt selbst in **18** eine verlangsamte Spaltung, was möglicherweise mit einer ungünstigen, unnatürlichen Konformation dieses Dinucleosidmonophosphates in Zusammenhang steht.

5. Schlussbemerkungen. - Die nach der Phosphortriester-Methode hergestellten fünf unnatürlichen Dinucleosidmonophosphate **16-20** stellen insofern interessante Verbindungstypen dar, als in ihnen durch die Verwendung von Lumazinen als Aglykonen der spektrale Bereich für Untersuchungen intramolekularer Wechselwirkungen wesentlich erweitert ist. So findet man für **16-19** nicht nur in den UV-Spektren eine signifikante bathochrome Verschiebung der langwelligen Absorptionsbande im Vergleich zu den monomeren Bausteinen, sondern auch die Hypochromizitäten zeigen in Abhängigkeit von der chemischen Struktur und Verknüpfungsart des Lumazinteils speziell bei **16**, **17** und **20** erstaunlich hohe Werte, die einer begünstigten Basenstapelung zugeschrieben werden. Eine Erweiterung der Korrelationen zwischen den UV-Daten und Hypochromizitäten durch CD-spektroskopische Effekte ist aus prinzipiellen Erwägungen nicht möglich, da der Circulardichroismus auf konformative Änderungen im Molekelaufbau stark anspricht. Die freien Dinucleosidmonophosphate **16-20** liessen auch bei den enzymatischen Spaltungen mit Milz- und Schlangengift-Phosphodiesterasen ihre strukturelle Besonderheit erkennen, die generell in einer verlangsamten Spaltungsgeschwindigkeit der Internucleotidbindung besteht, wobei die Hemmeffekte gegenüber Milz-PDE stärker in Erscheinung treten. Das 6,7-Diphenyllumazylyl-(3' → 5')-adenosinmonophosphat (**19**) ist während 24 Std. nahezu resistent gegen dieses Enzym, wo-

durch dem 6,7-Diphenyllumazinaglykon für zukünftige Untersuchungen gewisse Bedeutung als Kettenterminator für das 5'-Ende von bestimmten enzymresistenten Oligonucleotiden zukommen dürfte.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Fonds der Chemischen Industrie* für finanzielle Hilfe und Frau *M. Bischler* für die Bestimmung der physikalischen Daten.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Siehe [1]. Ausserdem: Die CD.-Spektren wurden mit Cary-Recording-Spectrometer, Modell 1115/60 der Fa. *Appl. Physics* aufgenommen, wobei die Extinktionswerte und Elliptizitäten entweder auf den elementaranalytisch bestimmten oder durch Phosphat-Analyse ermittelten Mol-Massen basieren. Für die Dünnschicht- und Papierelektrophorese wurden als Fließmittel (v/v) folgende Systeme verwendet: A): Chloroform/Methanol 9:1; B): 1-Butanol/5N Essigsäure 2.1; C): 2-Propanol/konz. Ammoniak-Lösung/Wasser 7:1:2. Die Auswertung der Chromatogramme wurde mit Hilfe von UV.-Licht der Wellenlängen 254 und 366 nm bzw. durch Besprühen mit 10proz. Perchlorsäure-Lösung bewerkstelligt. Phosphodiesterase aus Schlangengift (EC 3.1.4.1) (1 mg/1 ml) und Phosphodiesterase aus Kalbmilz (EC 3.1.4.18) (2 mg/1 ml) wurden von *Boehringer*, Mannheim, bezogen. 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid (TPS) stammt von *Fluka AG* und *p*-Tosyltriazolid wurde nach den Angaben von *Narang et al.* [68] hergestellt.

2. *Allgemeine Herstellungsmethode für die Dinucleosidmonophosphatriester 6-8.* Die Lösung von 1 mmol frisch bereitetem Pyridinium β -Cyanoäthylphosphat [26] in 3 ml abs. Pyridin wird mit 2 mmol Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid (TPS) oder 2,7 mmol *p*-Tosyltriazolid bei RT. versetzt und 1 Std. gerührt. Man gibt dann 0,313 g (0,5 mmol) *N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-monomethoxytrityl-2'-desoxyadenosin (1) [65] zu und rührt weitere 18-24 Std. bei RT. Das Gemisch wird anschliessend mit Eiswasser hydrolysiert und der Diester 2 durch 4maliges Ausschütten mit je 5 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und dann i.V. zum amorphen Festprodukt eingedampft. Man nimmt den Rückstand mehrmals mit abs. Pyridin auf, dampft jeweils im RV. ein und löst ihn schliesslich in 3 ml abs. Pyridin versetzt, mit 0,3 g (1 mmol) TPS und, nach 30-60 Min. Aktivierung des Diesters, mit 0,75-1 mmol der zweiten Nucleosidkomponente 3-5 [8]. Es wird 1-2 Tage bei RT. im Dunkeln gerührt, bis die Hauptmenge des fluoreszierenden Lumazinnucleosids verbraucht ist. Man hydrolysiert mit Eiswasser durch 2 Std. Rühren, extrahiert 4mal mit je 5 ml Chloroform, wäscht die vereinigten Extrakte mit Wasser und trocknet die organische Phase über Na₂SO₄. Nach Einengen i.V. wird der gelbliche Rückstand in 2 ml abs. Pyridin gelöst, 0,154 g (0,5 mmol) Monomethoxytritylchlorid zugegeben und 24 Std. bei RT. im Dunkeln gerührt. Anschliessend wird die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Methanol gestoppt, die Lösung zur Trockne eingedampft und der Rückstand in wenig Chloroform aufgenommen. Man trägt auf 2 präparative Kieselgelplatten (40×20×0,2 cm) auf und entwickelt mit Chloroform/Methanol 9:1. Die Hauptbande wird mit Aceton/Methanol 1:1 eluiert, das Eluat im RV. eingedampft, der Rückstand in Chloroform aufgenommen, von wenig Ungelöstem (Kieselgel) abfiltriert, erneut eingedampft und dann der Rückstand nach Lösen in Dioxan/Wasser 1:1 lyophilisiert.

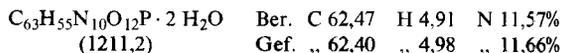
2.1. *N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-monomethoxytrityl-2'-desoxyadenylyl-(3'→5')-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-lumazin- β -cyanoäthylester (6) wird nach Lyophilisieren aus Dioxan/Wasser in Form eines farblosen amorphen Feststoffes mit Smp. 128-130° (Zers.) erhalten. Ausbeute: 0,087 g (17%).

C ₅₁ H ₄₇ N ₁₀ O ₁₂ P · 4,5 H ₂ O	Ber. C 55,48	H 5,11	N 12,68	P 2,80%
(1105,0)	Gef. „ 55,57	„ 4,47	„ 11,82	„ 2,93%

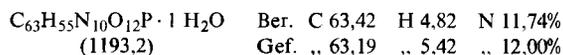
2.2. *N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-monomethoxytrityl-2'-desoxyadenylyl-(3'→5')-6,7-dimethyl-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-lumazin- β -cyanoäthylester (7) fällt nach Lyophilisieren aus Dioxan/Wasser in Form eines schwach gelblichen amorphen Feststoffes mit Smp. 155-157° an. Ausbeute: 0,157 g (30%).

C ₅₃ H ₅₁ N ₁₀ O ₁₂ P · 3,5 H ₂ O	Ber. C 57,14	H 5,24	N 12,57%
(1114,1)	Gef. „ 56,87	„ 4,68	„ 12,80%

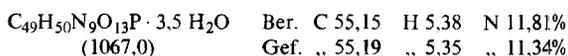
2.3. *N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-monomethoxytrityl-2'-desoxyadenyl-(3' → 5')-6,7-diphenyl-1-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin-(β-cyanoäthyl)ester (8) wird durch Lyophilisieren aus Dioxan/Wasser als gelblicher amorpher Feststoff mit Smp. 153–155° gewonnen. Ausbeute: 0,187 g (32%).



3. 6,7-Diphenyl-5'-*O*-monomethoxytrityl-1-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyllumazylyl-(3' → 5')-*N*⁶-benzoyl-2'-desoxyadenosin-β-cyanoäthyl)ester (9). - 3.1. Analog vorstehend aus 6,7-Diphenyl-5'-*O*-monomethoxytrityl-2'-desoxy-1-β-D-ribofuranosyllumazin (21) [1] und *N*⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosin (25) [65] werden im Eintopfverfahren lediglich 0,03 g (6%) gelbliches amorphes Festprodukt nach Lyophilisieren aus Dioxan/Wasser erhalten. 3.2. Die jeweilige Lösung von 0,67 g (0,71 mmol) Triäthylammonium-6,7-diphenyl-1-(5'-*O*-monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-*O*-β-cyanoäthylphosphat (23) in abs. Pyridin wird mehrfach i.RV. zur Trockne eingedampft, der Rückstand dann in 2 ml abs. Pyridin aufgenommen, mit 0,9 g (3 mmol) TPS zur Aktivierung versetzt und nach 45 Min. Rühren bei RT. 0,71 g (2 mmol) *N*⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosin (25) zugegeben. Nach 2 Tagen Rühren im Dunkeln wird mit Eiswasser behandelt, das Gemisch 4mal mit je 5 ml Chloroform extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen, dann über Na₂SO₄ getrocknet und anschliessend i.V. zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Chloroform gelöst, auf präp. Kieselgelplatten (40 × 20 × 0,2 cm) aufgetragen, mit Chloroform/Methanol 9:1 entwickelt und die blau fluoreszierende Hauptbande mit Aceton/Methanol 1:1 eluiert. Eindampfen, erneutes Lösen in Chloroform, Filtrieren von wenig Ungelöstem, erneutes Eindampfen i.RV. und Lyophilisieren aus Dioxan/Wasser ergeben 0,422 g (36%) gelblichen amorphen Feststoff, der ab 126° erweicht und sich bei 150–160° zersetzt.



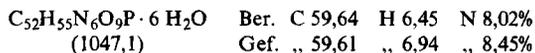
4. 6,7-Dimethyl-1-(5'-*O*-monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazylyl-(3' → 5')-6,7-dimethyl-1-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin-β-cyanoäthyl)ester (10). Die Lösung von 0,325 g (0,4 mmol) Triäthylammonium-6,7-dimethyl-1-(5'-*O*-monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-*O*-(β-cyanoäthyl)phosphat (24) in 1 ml abs. Pyridin wird bei RT. mit 0,36 g (1,6 mmol) *p*-Tosyltriaolid 30 Min. gerührt und anschliessend mit 0,15 g (0,5 mmol) 6,7-Dimethyl-2'-desoxy-1-β-D-ribofuranosyllumazin (4) als zweiter Komponente für die Kondensation zum Dinucleosidphosphotriester 10 versetzt. Nach 48 Std. Rühren bei RT. im Dunkeln wird analog vorstehend aufgearbeitet. Man erhält nach Eindampfen des Eluats, Aufnehmen des Rückstands in Chloroform, Filtrieren, erneutes Eindampfen im RV. und Lyophilisieren aus Dioxan/Wasser 0,224 g (55%) schwach gelblichen amorphen Feststoff, der ab 148° erweicht und sich bei 163–165° zersetzt.



5. Allgemeine Vorschrift zur Detritylierung der vollgeschützten Dinucleosidphosphatriester 6–10 zu 11–15. Man rührt 0,1 mmol Dinucleosidphosphatriester 6–10 in 1 ml 80proz. Essigsäure bei RT. so lange, bis das Ausgangsprodukt chromatographisch (Kieselgel: Chloroform/Methanol 9:1) nicht mehr nachweisbar ist. Man setzt dann etwas Äthanol zu, engt i.V. ein, nimmt den Rückstand in Chloroform auf und chromatographiert auf einer präp. Kieselgelplatte (40 × 20 × 0,2 cm) im System Chloroform/Methanol 9:1. Die blau fluoreszierende Hauptbande wird mit Chloroform/Methanol 1:1 eluiert, zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Chloroform aufgenommen, von wenig Ungelöstem abfiltriert und dann nach erneutem Eindampfen im RV. aus Dioxan/Wasser lyophilisiert, wobei die Dinucleosidphosphatriester 11 (73%), 12 (77%), 13 (88%), 14 (80%) und 15 (80%) als farblose bis schwach gelbliche Feststoffe erhalten werden.

6. Allgemeine Vorschrift zur Überführung der Phosphotriester 11–15 in die Ammoniumsalze der Dinucleosidmonophosphate 16–20. Man rührt 0,05 mmol Dinucleosidphosphatriester 11–15 in 3 ml Dioxan/25proz. wässr. Ammoniak-Lösung 2:1 bei RT. im Dunkeln so lange, bis chromatographisch kein Ausgangsprodukt mehr nachgewiesen werden kann. Man verdünnt etwas mit Wasser, extrahiert mehrmals mit je 5 ml Chloroform und lyophilisiert dann die wässrige Phase, wobei die Ammoniumsalze der Dinucleosidmonophosphate 16 (81%), 17 (80%), 18 (88%), 19 (80%) und 20 (80%) in chromatographisch und elektrophoretisch reiner Form als farblose Feststoffe erhalten werden.

7. *Triäthylammonium-6,7-diphenyl-1-(5'-O-monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (23)*. Die Lösung von 1,8 g (2,5 mmol) 6,7-Diphenyl-1-(5'-O-monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin (21) [1] und 5 mmol Pyridinium-(β-cyanoäthyl)-phosphat [26] in 5 ml abs. Pyridin wird mit 3,0 g (10 mmol) TPS versetzt und dann 24 Std. bei RT. im Dunkeln gerührt. Anschliessend wird mit Eiswasser hydrolysiert, Triäthylamin bis pH 8 zugegeben und nach weiteren 3 Std. Rühren 10mal mit je 5 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nochmals mit Wasser gewaschen, dann über Na₂SO₄ getrocknet und auf ein kleines Volumen eingengt. Man gibt auf eine Kieselgelsäule (35 × 4 cm) und entwickelt mit Chloroform/1proz. methanolischem Triäthylamin 9:1. Die blau fluoreszierende Hauptfraktion wird gesammelt und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird dann in wenig Chloroform gelöst und langsam unter starkem Rühren in abs. Äther eingetropfelt, wobei sich ein schwach gelblicher Feststoff abscheidet, der nach Trocknen i.V. bei 30° einen Smp. von 158–160° zeigt. Ausbeute: 1,525 g (65%).



8. *Triäthylammonium-6,7-dimethyl-1-(5'-O-monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazin-3'-(β-cyanoäthyl)phosphat (24)*. Die Lösung von 0,29 g (0,5 mmol) 6,7-Dimethyl-1-(5'-O-monomethoxytrityl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-lumazine (22) [1] und Pyridinium-(β-cyanoäthyl)phosphat (hergestellt aus 0,48 g (1,5 mmol) Barium-cyanoäthylphosphat [26]), in 2 ml abs. Pyridin wird mit 0,6 g (2,7 mmol) *p*-Tosyltriaxolid versetzt und dann 16 Std. im Dunkeln bei RT. gerührt. Man gibt dann 2 ml Eiswasser zu, rührt nochmals 30 Min. und extrahiert dann 6mal mit je 5 ml Chloroform. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit Wasser gewaschen und dann über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Einengen auf ein kleines Volumen wird auf Kieselgelplatten (40 × 20 × 0,2 cm) aufgetragen, mit Chloroform/1proz. methanolischem Triäthylamin 9:1 entwickelt und die Hauptzone mit Chloroform/Methanol 1:1, dem wenige Tropfen Triäthylamin zugesetzt sind, eluiert. Nach Eindampfen wird in Chloroform aufgenommen, von wenig Ungelöstem abfiltriert und nach Konzentrieren auf ein kleines Volumen langsam unter starkem Rühren in 100 ml abs. Äther eingetropfelt. Der farblose Niederschlag wird abzentrifugiert, mehrmals mit abs. Äther digeriert und gewaschen und dann i.V. bei RT. über P₂O₅ getrocknet. Ausbeute: 0,2 g (50%) farbloser, amorpher Feststoff mit Smp. 168–171°.

9. *Enzymatische Spaltungen*. Man mischt 2–3 OD Substrat (bezogen auf die langwellige Absorptionsbande im UV.), 5 μl 1M Tris/HCl-Puffer pH 8,9 und 5 μl 0,1M MgCl₂-Lösung, ergänzt mit Wasser auf 125 μl, gibt dann 2 μl Schlangengiftphosphodiesterase zu und inkubiert 6 bzw. 24 Std. bei 37°. Ein analoger Ansatz ohne Enzym wird gleich behandelt und dient als Bezugssystem. Anschliessend werden beide Ansätze getrennt auf *Whatman*-Paper 3MM aufgetragen, in 2-Propanol/konz. Ammoniak-Lösung/Wasser 7:1:2 bzw. 1-Butanol/5N Essigsäure 2:1 chromatographiert und durch Eluieren des unveränderten Dinucleosidphosphates mit Wasser und spektroskopische Gehaltsbestimmung im Vergleich zum eingesetzten Substrat im Referenzansatz die prozentuale Spaltung ermittelt.

Die Spaltungen mit Milz-Phosphodiesterase werden analog vorstehend durchgeführt, wobei sich der Inkubationsansatz folgendermassen zusammensetzt: Man mischt 2–3 OD Substrat (bezogen auf das langwellige Maximum im UV.) und 20 μl eines Puffer-Cocktails (hergestellt aus 30 μl 1M Kaliumphosphat pH 6,2, 25 μl 0,1M EDTA-Natriumsalz pH 7, 30 μl 1proz. wässr. Tween 80 und 115 μl Wasser), ergänzt mit Wasser auf 125 ml, setzt dann 2 μl Enzym zu und inkubiert 6 bzw. 24 Std. bei 37°. Als Referenz dient der gleiche Ansatz ohne Enzymzugabe.

10. *Bestimmung der Hypochromizitäten der Dinucleosidphosphate durch Enzymspaltung*. In zwei Ansätzen werden jeweils 3,5–5 OD Substrat in ca. 100 μl Wasser mit 5 μl Tris/HCl-Puffer pH 8,9 und 5 μl 0,1M MgCl₂-Lösung versetzt und nach Zugabe von je 10 μl Schlangengift-Phosphodiesterase bei 37° inkubiert. Die erste Probe dient zur chromatographischen Verfolgung der enzymatischen Spaltung, die alle 30 Min. überprüft wird. Nach vollständiger Hydrolyse des Dinucleosidmonophosphates zu den monomeren Bausteinen wird die zweite Probe im Messkolben auf 5 ml mit Phosphat-Puffer pH 7 verdünnt und gegen eine Referenzlösung gleicher Zusammensetzung ohne Substrat die Extinktionsänderung des langwelligen Maximums des Lumazin-Teils spektrophotometrisch ermittelt bzw. die prozentuale Hypochromizität gemäss folgender Beziehung berechnet:

$$\% \text{ Hypochromizität} = \left(1 - \frac{E_{\text{Dimer}}}{E_{\text{Monomer}}} \right) \cdot 100.$$

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Charubala & W. Pfeleiderer, *Helv.* 62, 1171 (1979).
- [2] J.A. McCloskey & S. Nishimura, *Accounts chem. Res.* 10, 403 (1977); S. Nishimura, *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 12, 49 (1972).
- [3] 'Chemistry, Biology and Clinical Uses of Nucleoside Analogs', Ed. A. Block, Am. N.Y. Acad. Sci. 1975, 255; T. Y. Shen, *Angew. Chem.* 82, 730 (1970); G.D. Diana & F. Pancic, *ibid.* 88, 458 (1976); G. Wagner, *Die Pharmazie* 26, 377 (1971).
- [4] A. Kornberg, 'DNA-Synthesis', S.67ff., W.H. Freeman and Company, Syn Francisco 1974.
- [5] K. Hoogsten, *Acta crystallogr.* 12, 822 (1959).
- [6] P.R. Schimmel, *Accounts chem. Res.* 10, 411 (1977).
- [7] W. Pfeleiderer, *Physical Meth. heterocycl. Chemistry*, Vol. 1, 177. Ed. A.R. Katritzky, Academic Press, New York 1963.
- [8] G. Ritzmann & W. Pfeleiderer, *Chem. Ber.* 106, 1401 (1973); W. Pfeleiderer, G. Ritzmann, K. Harzer & J.C. Jochims, *Chem. Ber.* 106, 2982 (1973); G. Ritzmann, K. Ienaga & W. Pfeleiderer, *Liebigs Ann. Chem.* 1977, 1217.
- [9] F. Cramer, *Angew. Chem.* 78, 186 (1966); F. Cramer, *Accounts chem. Res.* 2, 338 (1969); K.L. Agarwal, A. Yamazaki, P.J. Cashion & H.G. Khorana, *Angew. Chem.* 84, 489 (1972); J.B. Hobbs, *Organophosphorus Chemistry* 6, 146 (1974); R.I. Zhdanov, *Synthesis* 1975, 222; H. Kössel & H. Seliger, *Fortschr. chem. org. Naturstoffe*, Bd. 32, 297, Ed. W. Herz, H. Griesbach, G.W. Kirby, Springer-Verlag, Wien, New York 1975; A. Amarnath & A.C. Broom, *Chem Rev.* 77, 183 (1977).
- [10] M. Smith, D.H. Rammner, I.H. Goldberg & H.G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* 84, 430 (1962); D.H. Rammner & H.G. Khorana, *ibid.* 84, 3112 (1962); Y. Lapidot & H.G. Khorana, *ibid.* 85, 1989, 3857 (1963); D. Söll & H.G. Khorana, *ibid.* 87, 360 (1965).
- [11] R.L. Letsinger & V. Mahadevan, *J. Amer. chem. Soc.* 87, 3526 (1965).
- [12] R.L. Letsinger & K.K. Ogilvie, *J. Amer. chem. Soc.* 89, 4801 (1967).
- [13] C.B. Reese & R. Saffhill, *Chem. Commun.* 1968, 767.
- [14] F. Eckstein & I. Rizk, *Chem. Ber.* 102, 2362 (1969).
- [15] T. Neilson, *Chem. Commun.* 1969, 1139.
- [16] R.L. Letsinger & K.K. Ogilvie, *J. Amer. chem. Soc.* 91, 3350 (1969).
- [17] R.L. Letsinger, K.K. Ogilvie & P.S. Miller, *J. Amer. chem. Soc.* 91, 3360 (1969).
- [18] G.W. Grams & R.L. Letsinger, *J. org. Chemistry* 35, 868 (1970).
- [19] J.H. van Boom, P.M.J. Burgers, G.R. Owen, C.B. Reese & R. Saffhill, *Chem. Commun.* 1971, 869.
- [20] P.S. Miller, K.N. Fang, N.S. Kondo & P.O.P. Ts'o, *J. Amer. chem. Soc.* 93, 6657 (1971).
- [21] T. Neilson & E.S. Werstiuk, *Canad. J. Chemistry* 49, 3004 (1971).
- [22] E.S. Werstiuk & T. Neilson, *Canad. J. Chemistry* 50, 1283 (1972).
- [23] J. Smrt, *Tetrahedron Letters* 1972, 3427.
- [24] J. Smrt, *Collect. Czechoslov. chem. Commun.* 37, 846 1870 (1972).
- [25] S.A. Narang, O.S. Banot, J. Goodchild, R.H. Wightman & S.K. Dheer, *J. Amer. chem. Soc.* 94, 6183 (1972).
- [26] W. Falk & C. Tamm, *Helv.* 55, 1928 (1972).
- [27] K.K. Ogilvie & K. Krocke, *Canad. J. Chemistry* 50, 1211 (1972).
- [28] J. Smrt, *Collect. Czechoslov. chem. Commun.* 38, 3189, 3642 (1973).
- [29] N.J. Cusack, C.B. Reese & J.H. van Boom, *Tetrahedron Letters* 1973, 2209.
- [30] K. Itakura, C.P. Bahl, N. Katagiri, J.J. Michniewicz, R.N. Wightman & S.A. Narang, *Canad. J. Chemistry* 51, 3649 (1973).
- [31] J.C. Catlin & F. Cramer, *J. org. Chemistry* 38, 245 (1973).
- [32] T. Neilson, E.V. Wastrowowski & E.S. Werstiuk, *Canad. J. Chemistry* 51, 1068 (1973).
- [33] E.S. Werstiuk & T. Neilson, *Canad. J. Chemistry* 51, 1889 (1973).
- [34] T. Neilson & E.S. Werstiuk, *J. Amer. chem. Soc.* 96, 2295 (1974).
- [35] J. Smrt, *Collect. Czechoslov. chem. Commun.* 40, 1043 (1975).
- [36] K. Itakura, N. Katagiri, C.P. Bahl, R.N. Wightman & S.A. Narang, *J. Amer. chem. Soc.* 97, 7327 (1975).
- [37] A. Myles, W. Hutzenlaub, G. Reitz & W. Pfeleiderer, *Chem. Ber.* 108, 2875 (1975).
- [38] R.L. Letsinger, J.L. Finnan, G.A. Heauner & W.B. Lunsford, *J. Amer. chem. Soc.* 97, 3278 (1975).

- [39] S.A. Narang, K. Itakura & N. Katagiri, *Canad. J. Biochemistry* 53, 392 (1975).
- [40] K. Grzeskowiak, J. Stawinski & M. Wiewiorowski, *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. chim.* 23, 495 (1975).
- [41] R.W. Adamiak, M.Z. Barciszewska, E. Biala, K. Grzeskowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, W.T. Markiewicz & M. Wiewiorowski, *Nucleic Acid Res.* 3, 3397 (1976).
- [42] R.L. Letsinger & W.B. Lunsford, *J. Amer. chem. Soc.* 98, 3655 (1976).
- [43] E.S. Werstiuk & T. Neilson, *Canad. J. Chemistry* 54, 2689 (1976).
- [44] J.H. van Boom, P.M.J. Burgers & C.A.G. Haasnoot, *Nucleic Acid Res.* 3, 2731 (1976).
- [45] J.H. van Boom, P.M.J. Burgers, J. den Hertog, G. van der Marel, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 95, 108 (1976).
- [46] P. Cashion, K. Porter, T. Cadger, G. Sathe, T. Tranquilla, H. Notman & E. Jay, *Tetrahedron Letters* 1976, 3769.
- [47] E. Ohtsuka, T. Tanaka & M. Ikehara, *Chem. pharm. Bull.* 24, 2143 (1976).
- [48] J.H. van Boom & P.M.J. Burgers, *Tetrahedron Letters* 1976, 4875.
- [49] C.B. Reese, *Phosphorus and Sulfur* 1, 245 (1976).
- [50] J. Stawinski, T. Hozumi, S.A. Narang, C.P. Bahl & R. Wu, *Nucleic Acid Res.* 4, 353 (1977).
- [51] J.H. van Boom, P.M.J. Burgers, R. Crea, G. van der Marel & G. Wille, *Nucleic Acid Res.* 4, 747 (1977).
- [52] R. Arentzen & C.B. Reese, *J. chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1977, 445.
- [53] J.H. van Boom, P.M.J. Burgers, G. van der Marel, C.H.M. Verdegaal & G. Wille, *Nucleic Acid Res.* 4, 1047 (1977).
- [54] R.W. Adamiak, R. Arentzen & C.B. Reese, *Tetrahedron Letters* 1977, 1431.
- [55] G.W. Daub & E.E. van Tamelen, *J. Amer. chem. Soc.* 99, 3526 (1977).
- [56] A.K. Sood & S.A. Narang, *Nucleic Acid Res.* 4, 2757 (1977).
- [57] K.K. Ogilvie, N. Theriault & K.L. Sadana, *J. Amer. chem. Soc.* 99, 7741 (1977).
- [58] P. Cashion, H. Notman, G. Sathe, T. Cadger, K. Porter & E. Jay, *Nucleic Acid Res.* 4, 2593 (1977).
- [59] J.H. van Boom, P.M.J. Burgers, C.A.G. Haasnoot & C.B. Reese, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 96, 91 (1977).
- [60] J.H. van Boom, *Heterocycles* 7, 1197 (1977); C.B. Reese, *Tetrahedron* 34, 3143 (1978).
- [61] A.F. Markham, T. Miyake, E. Ohtsuka & M. Ikehara, *Heterocycles* 7, 229 (1977).
- [62] R.W. Adamiak, E. Biala, K. Grzeskowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, W.T. Markiewicz, J. Okupniak, J. Stawinski & M. Wiewiorowski, *Nucleic Acid Res.* 5, 1889 (1978).
- [63] J.H. van Boom & P.M.J. Burgers, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 97, 73 (1978).
- [64] K.L. Agarwal & F. Riftina, *Nucleic Acid Res.* 5, 2809 (1978).
- [65] H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch & H.F. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 3821 (1963).
- [66] H. Schaller & H.G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 3828 (1963).
- [67] R. Lohrmann & H.G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* 88, 829 (1966).
- [68] N. Katagiri, K. Itakura & S.A. Narang, *J. Amer. chem. Soc.* 97, 7332 (1975).
- [69] C.H. Fiske & Y. Subbarow, *J. biol. Chemistry* 66, 375 (1925).
- [70] M.M. Warshaw & I. Tinoco, jr., *J. mol. Biol.* 10, 29 (1966).
- [71] M. Hattori & W. Pfeleiderer, *Liebigs Ann. Chem.* 1978, 1780.
- [72] C.R. Cantor, M.M. Warshaw & H. Shapiro, *Biopolymers* 9, 1062 (1970).
- [73] C.A. Bush & H.A. Scheraga, *Biopolymers* 7, 395 (1969).