

## 263. Nucleoside und Nucleotide. Teil 14. Synthese des Octanucleosidheptaphosphats d(G-A-T-T-T-T-G-A)<sup>1)</sup>

von Peter Bühlmayer, Georg Graf, Felix Waldmeier und Christoph Tamm<sup>2)</sup>

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

(8.IX.80)

---

### Nucleosides and Nucleotides.

#### Part 14. Synthesis of the Octanucleosideheptaphosphate d(G-A-T-T-T-T-G-A)

##### Summary

The synthesis of the oligonucleotide d(G-A-T-T-T-T-G-A) by the diester method is described. The condensations were performed using dinucleotide blocks carrying suitable protecting groups. The intermediary products were d(G-A), d(G-A-T-T) and d(G-A-T-T-T-T). These intermediates and the final product were characterized by UV. spectroscopy, high pressure liquid chromatography (HPLC.) and enzymatic degradation. The cleavage products were separated and analyzed by paper chromatography or HPLC. with an anion exchange column. They yielded the corresponding nucleosides and nucleotides in the correct ratios.

---

**1. Einleitung.** – Im Rahmen einer umfangreicheren Untersuchung über die Spezifität der DNA-Polymerase I [2] benötigen wir das Oligonucleotid d(G-A-T-T-T-T-G-A). Als Syntheseverfahren wählen wir die Diestermethode, mit Hilfe derer z.B. *Khorana et al.* ein Struktur-Gen für eine Alanin-Transfer-RNA aus Hefe [3] sowie für den Vorläufer einer Tyrosin-Suppressor-tRNA aus *Escherichia coli* [4] und *Köster et al.* ein Struktur-Gen für das Peptidhormon Angiotensin II [5] hergestellt haben. Die Diestermethode hat sich bei der Synthese von Oligonucleotiden auch in unseren Laboratorien bewährt [6–9].

**2. Synthesepplan und Schutzgruppen.** – Bei der Synthese eines Oligonucleotids durch schrittweises Anfügen eines 5'-Mononucleotids an die 3'-Hydroxygruppe des wachsenden Stranges treten bei der Reinigung der länger-kettigen Produkte durch Ionenaustauschchromatographie häufig Schwierigkeiten auf. Deshalb sind möglichst grosse Ladungsunterschiede zwischen Produkt und Reaktanten, d.h. Verwendung von oligomeren 5'-Phosphatkomponenten, vorteilhaft. Andererseits ist die Verwendung längerer 5'-Phosphatkomponenten oft unwirtschaftlich, da diese häufig

---

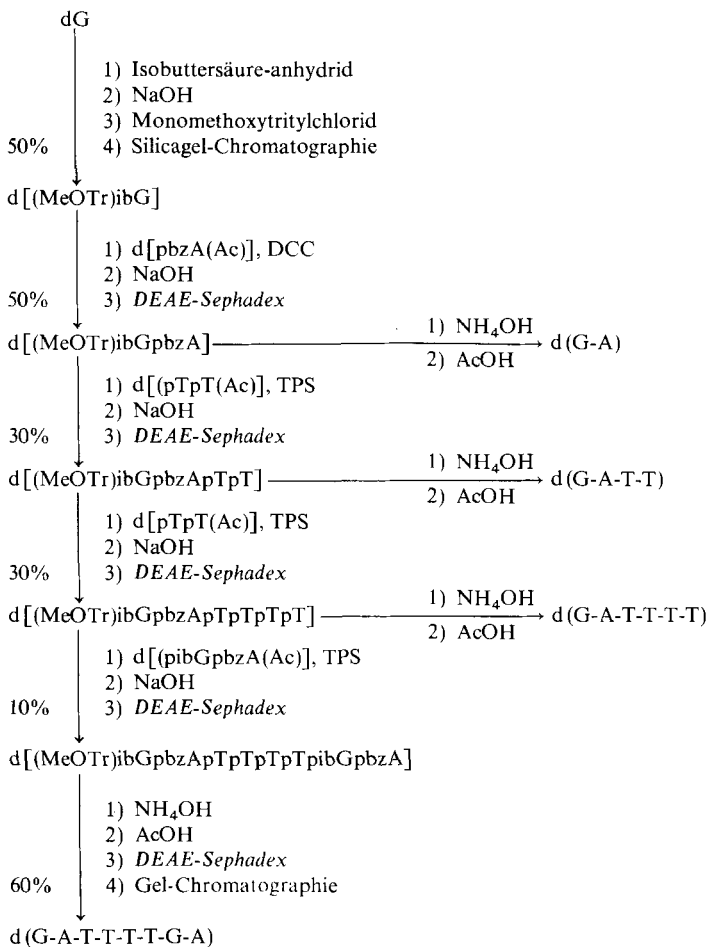
<sup>1)</sup> Teil 13, s. [1].

<sup>2)</sup> Korrespondenz-Autor.

in grossem Überschuss eingesetzt werden müssen. Ausserdem können bei längeren Phosphatkomponenten mehr Nebenprodukte durch Aktivierung ihrer Phosphodiestergruppen gebildet werden, wie *Knorre et al.* [10] mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR.-Spektroskopie gezeigt haben. Aus diesen Gründen schien uns ein schrittweiser Aufbau des Octanucleosidheptaphosphats mit dimeren Blöcken am besten geeignet. Bei diesem Verfahren konnte auch ein verhältnismässig einfach zugängliches Dinucleotid zweimal verwendet werden (vgl. *Schema*). In den meisten Fällen liessen sich nach erfolgter Kondensation die nicht umgesetzten Reaktanten, vor allem die Überschüsse der 5'-Phosphatkomponenten, zum grössten Teil zurückgewinnen.

Als Schutzgruppen verwendeten wir die folgenden, bei der Diestermethode üblichen und gut beschriebenen Reste [4]: Isobutyryl (ib) für Guanin, Benzoyl (bz) für Adenin, Acetyl (Ac) für die 3'-Hydroxygruppe, Cyanoethyl (CNEt) für die

Schema. Synthese von *d*(G-A-T-T-T-G-A)



5'-Phosphatgruppe und Monomethoxytrityl (MeOTr) für die endständige 5'-Hydroxygruppe des wachsenden Stranges. Monomethoxytrityl-Verbindungen wurden auf den Dünnschichtchromatogrammen durch Besprühen und Erwärmen mit 10proz. Perchlorsäure sichtbar gemacht. Die Stabilität der Schutzgruppen unter den Bedingungen der Kondensationen und die Selektivität der Abspaltung liessen in einigen Fällen zu wünschen übrig. Die dadurch entstandenen Nebenprodukte erschwerten die Trennung und Identifizierung der Produkte. Wie weit neuere Schutzgruppen, wie 2-Methylbutyryl [11] für Guanin, *t*-Butyldiphenylsilyl [12] für die 3'-Hydroxygruppe, «Pixyl» [13] für die 5'-Hydroxygruppe, 2-(*p*-Tritylphenyl)sulfonyläthyl [14] und 8-Chinolyl [15] für Phosphat Verbesserungen bringen könnten, wurde nicht untersucht. Die geschützten, monomeren Einheiten wurden nach Vorschriften der Literatur hergestellt (s. exper. Teil). Die Kondensationen erfolgten im wesentlichen nach dem Verfahren von *Khorana et al.* [3] [4]. Das *Schema* vermittelt einen Überblick über den eingeschlagenen Syntheseweg.

**3. Synthese von d[(MeOTr)ibGpbzA], d[pTpT] und d[pibGpbzA].** – Die Reaktionsbedingungen für die durchgeführten Kondensationen sind in *Tabelle 1* zusammengefasst. Bei der Synthese von d[(MeOTr)ibGpbzA] wurde auf ein Eindampfen der beiden Komponenten **A** und **B** in Pyridin vor Beginn der Reaktion verzichtet, da sich das Gemisch relativ rasch verfärbte. Die Reaktanten wurden daher während einem bis zwei Tagen im Hochvakuum bei Raumtemperatur vortrocknet. Als Kondensationsmittel diente Dicyclohexylcarbodiimid (DCC). Nach der Aufarbeitung und der selektiven Abspaltung der 3'-*O*-Acetylgruppe mit NaOH wurde das jeweils dunkelgefärbte Reaktionsgemisch an *DEAE-Sephadex* aufgetrennt. Da das Dinucleosidmonophosphat kaum wasserlöslich ist, wurde als Eluierungsmittel ein Gradient von Ammoniumhydrogencarbonat in 50proz. Äthanol verwendet. Das gewünschte Hauptprodukt wurde bei einer Pufferkonzentration von 0,02–0,03M eluiert, was einer negativen Ladung entspricht. Nach einer anderen Methode wurde das Produkt durch Extraktion der wässrigen Lösung mit Essigester isoliert [16].

Die Synthese des Dinucleotids d(pTpT) wurde im wesentlichen nach [17] mit DCC durchgeführt. Da bei der Chromatographie an *DEAE-Sephadex* nach dem Eluieren des Hauptprodukts noch UV.-aktives Material anfiel, vermuteten wir, dass während der Reaktion Schutzgruppen abgespalten worden sind. Auch *Weiss & Hirschfeld* [18] hatten die Labilität der Cyanoäthylgruppe beobachtet.

Für die Synthese von d[pibGpbzA] wird in [17] der Einsatz von Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS) als Kondensationsmittel beschrieben. Da wir bei unseren Untersuchungen keine Verbesserung der Ausbeute mit DCC erzielen konnten, verwendeten wir ebenfalls das reaktivere TPS, welches die Reaktionsdauer wesentlich herabsetzte. Die Auftrennung des Reaktionsgemisches erfolgte an *DEAE-Sephadex* mit einem wässrigen Ammoniumhydrogencarbonat-Gradienten.

Die drei dimeren Produkte d[(MeOTr)ibGpbzA], d(pTpT) und d(pibGpbzA) konnten durch Lyophilisieren aus wässriger Lösung als dünnschichtchromatographisch reine, farblose Pulver erhalten werden (s. *Tabelle 5* im exper. Teil). Behandlung mit konz. Ammoniak zur Abspaltung der *N*-Acyl-Schutzgruppen und mit 80proz. Essigsäure zur Abspaltung der Monomethoxytritylgruppe lieferte d(G-A),

Tabelle 1. Reaktionsbedingungen und Ausbeuten

3'-OH-Komponente A	5'-P-Komponente B	Produkt
d[(MeOTr)ibG]	d[pbzA(Ac)]	d[(MeOTr)ibGpbzA]
d[(CNEt)pT]	d[pT(Ac)]	d(pTpT)
d[(CNEt)pibG]	d[pbzA(Ac)]	d(pibGpbzA)
d[(MeOTr)ibGpbzA]	d[pTpT(Ac)]	d[(MeOTr)ibGpbzApTpT]
d[(MeOTr)ibGpbzApTpT]	d[pTpT(Ac)]	d[(MeOTr)ibGpbzApTpTpT]
d[(MeOTr)ibGpbzApTpTpT]	d[pibGpbzA(Ac)]	d[(MeOTr)ibGpbzApTpTpTpTibGpbzA]

<sup>a)</sup> Bezüglich B.

<sup>b)</sup> Verhältnis Äquiv. TPS zur Anzahl sämtlicher, dissoziierbarer Phosphathydroxygruppen.

d(pT-T) bzw. d(pG-A). Der enzymatische Abbau der erhaltenen Verbindungen lieferte einen zusätzlichen Strukturbeweis (s. *Tabelle 3* im exper. Teil).

Acetylierung der beiden Dinucleotide d[pTpT] und d[pibGpbzA] mit einem 50fachen Überschuss an Essigsäureanhydrid in Pyridin lieferte d[pTpT(Ac)] bzw. d[pibGpbzA(Ac)]. Die Isolierung erfolgte entweder durch Ausfällen der konzentrierten Pyridinlösung in Äther (nach [19]) oder direkt durch mehrmaliges Lyophilisieren der wässrigen Reaktionslösung. Wurde nach der letzteren Methode verfahren, so waren im Dünnschichtchromatogramm minime Mengen an Verunreinigungen wahrnehmbar.

**4. Synthese von d[(MeOTr)ibGpbzApTpT].** – Der erste Versuch zur Blockkondensation von d[(MeOTr)ibGpbzA] mit d[pTpT(Ac)] ergab eine schlechte Ausbeute. Ein grösserer Überschuss an 5'-Phosphatkomponente führte zu keiner wesentlichen Verbesserung. Mit einem 10fachen Überschuss an d[pTpT(Ac)] wurde lediglich eine grosse Menge des symmetrischen Pyrophosphats d[TpT5'pp5'TpT] erhalten. Auch mit Mesitylensulfonylchlorid als Kondensationsmittel liess sich keine Verbesserung erzielen. Erst ein relativ grosser Überschuss an TPS, d.h. ein TPS/P-Verhältnis von ca. 1,6, führte zum Erfolg (s. *Tabelle 1*). Allerdings war bei der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches auf den pH-Wert der wässrigen Lösungen speziell zu achten, um die Abspaltung der Monomethoxytritylgruppen zu verhindern. Von *Berlin et al.* ist die Verwendung der Imidazole von Mesitylensulfonylchlorid und TPS als Kondensationsmittel vorgeschlagen worden [20]. In unseren Händen bewährten sich diese Reagenzien jedoch nicht [21]. Bei der Auftrennung des Reaktionsgemisches an *DEAE-Sephadex* musste erstens der Verzögerungseffekt der Monomethoxytritylgruppe und zweitens die gleiche Anzahl von negativen Ladungen in d(pTpT) und d[(MeOTr)ibGpbzApTpT] berücksichtigt werden. Wir verwendeten hierzu ein ähnliches Trennverfahren wie es *Schott et al.* [22] für tritylhaltige Substanzen benützt hatten. Zunächst wurde mit einem wässrigen Gradienten d[pTpT] eluiert. Anschliessend wurde mit Wasser der Puffer ausgewaschen und darauf ein neuer Gradient in 50proz. Äthanol eingesetzt, wodurch die tritylhaltigen Produkte eluiert wurden. Die Auftrennung des Reaktionsgemisches ist aus *Figur 1* (s. exper. Teil) ersichtlich.

Die Qualität der Trennung hing stark von der Grösse des Ansatzes ab. Der

## bei den Kondensationsreaktionen

Molares Verhältnis B/A	Menge in mol A	Äquiv. DCC <sup>a</sup> )	TPS/P <sup>b</sup> )	Reaktionsdauer [Std.]	Ausbeute [%]
1,05	0,05	10	—	120	50–55
1,05	0,1	10	—	120	55–60
1,1	0,24	—	1	4	35
1,5	0,04	—	1,6	5	35–40
5	0,03	—	1,0	5	35
10	0,01	—	0,8	3,5	10–15

Reaktant  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzA}]$  wurde offensichtlich zum Teil bereits im alkoholfreien Gradienten eluiert. Nach Einengen der vereinigten Fraktionen wurde das Produkt,  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpT}]$ , durch Lyophilisieren aus Wasser/Pyridin 9 : 1 isoliert. Im UV.-Spektrum liess sich die Überlagerung der Chromophore der Reaktanten erkennen. Chromatographisch liess sich das Produkt von  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzA}]$  und  $d[\text{pTpT}]$  noch gut unterscheiden (s. *Tabelle 5* im exper. Teil). *Poonian et al.* hatten das Tetranucleosidtriphosphat durch Kondensation von  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpApT}]$  mit  $d[\text{pT}(\text{Ac})]$  in einer Ausbeute von 40% hergestellt [23].

**5. Synthese von  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpT}]$ .** – Bei der Kondensation von  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpT}]$  und  $d[\text{pTpT}(\text{Ac})]$  erfolgt die Verknüpfung zwischen zwei Thymidinnucleotiden. Erwartungsgemäss waren die Ausbeuteprobleme wegen der wesentlich grösseren Stabilität der Pyrimidinbasen nicht so gross wie bei der Synthese von  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpT}]$ . Die 5'-Phosphatkomponente wurde in grossem Überschuss eingesetzt. Das TPS/P-Verhältnis wurde zur Schonung der längeren Kette kleiner gewählt. Die Auftrennung des Reaktionsgemisches ist in *Figur 2* (s. exper. Teil) dargestellt. Um die beiden Reaktanten **A** und **B** trennen zu können, verwendeten wir ein ähnliches Eluierungsverfahren wie bei der Synthese von  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpT}]$ . Nur 12–15% des Reaktanten **A** liessen sich zurückgewinnen. Da dieses Material noch verunreinigt war, wurde auf dessen Isolierung verzichtet. Das chromatographisch vom Reaktant **A** gut unterscheidbare Hauptprodukt zeigte im UV.-Spektrum erwartungsgemäss eine Zunahme des Verhältnisses  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235}$ . Von der eingesetzten Menge an  $d[\text{pTpT}(\text{Ac})]$  konnten 45% zurückgewonnen, gereinigt und wieder verwendet werden.

**6. Synthese von  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpTpibGpbzA}]$ .** – Für diese Umsetzung wurde ein 10facher Überschuss an  $d[\text{pibGpbzA}(\text{Ac})]$  eingesetzt. In Anbetracht der Labilität von Reaktanten und Produkt wurde eine kürzere Reaktionsdauer gewählt und das TPS/P-Verhältnis niedriger als bei der Synthese des geschützten Hexanucleotids gehalten. Erwartungsgemäss war die Ausbeute sehr niedrig. Der Reaktant **A** konnte nur in veränderter Form (UV.-Spektrum) zu 40% zurückgewonnen werden. Hingegen war  $d[\text{pibGpbzA}]$  in UV.-reiner Form zu 60% wieder isolierbar. Trotz ähnlicher Vorsichtsmassnahmen wie bei den oben beschriebenen

Kondensationen wurde sowohl während der Reaktion als auch bei der Aufarbeitung zu einem beträchtlichen Teil die Monomethoxytritylschutzgruppe abgespalten. Die Auftrennung des Reaktionsgemischs an *DEAE-Sephadex* mit einem Gradienten von Ammoniumhydrogencarbonat in 30proz. Äthanol ist aus *Figur 3* (s. exper. Teil) ersichtlich. Die Trennqualität war sehr stark von der Grösse des Ansatzes abhängig, wobei das octamere Produkt dünnschichtchromatographisch nicht vom hexameren Reaktanten unterscheidbar war. Das UV.-Spektrum des Produkts zeigte gegenüber der hexameren Vorstufe eine Zunahme der UV.-Absorption bei 280 nm, was der Überlagerung der Spektren der Reaktanten entspricht.

**7. Abspaltung der Schutzgruppen.** – Bei allen Produkten wurden zuerst mit konz. Ammoniak [17] die Aminoschutzgruppen, darauf mit 80proz. Essigsäure oder besser mit einem Gemisch von Essigsäure/Pyridin/Wasser 14:1:3 die Monomethoxytritylgruppe abgespalten. Beim octameren Endprodukt wurde nur die zweite Methode verwendet, da unter diesen Bedingungen selbst nach mehreren Tagen keine Basenabspaltung erfolgen soll [24].

Die nach Abspaltung der Schutzgruppen erhaltenen wässrigen Reaktionsgemische wurden entweder durch Extraktion mit Äther oder besser an *DEAE-Sephadex* sowie durch Gelfiltration an *Sephadex G-10* oder *G-25* gereinigt (vgl. *Fig. 4–6* im exper. Teil). Das Endprodukt d(G-A-T-T-T-G-A) wurde weder durch *DEAE*-Chromatographie noch durch anschliessende Gelchromatographie rein erhalten. Auch mit Hilfe des *Tomlinson-Tener*-Systems [25] wurde keine Verbesserung erzielt (s. *Fig. 5* im exper. Teil).

Schliesslich wurden alle ungeschützten Produkte noch mittels Hochdruckflüssigchromatographie mit einer *Reversed-Phase*-Säule untersucht [26]. Die verwendete Säule wies jedoch selbst unter den Bedingungen eines Gradienten (steigender Gehalt an Acetonitril) eine theoretische Bodenzahl von lediglich ca. 800 auf. Die Aussagekraft der Chromatographie bezüglich der Reinheit der Produkte ist deshalb begrenzt. Retentionszeiten und Acetonitrilgehalt bei den einzelnen Eluierungen der Produkte sind in *Tabelle 4* (s. exper. Teil) zusammengestellt.

Die isolierte Menge an Endprodukt betrug 2,3  $\mu\text{mol}$ . Aufgrund der Ausbeuten im *Schema* ergibt sich eine Gesamtausbeute von 0,14%. Eine Ausbeuten-Berechnung aufgrund der eingesetzten Substanzmengen und allenfalls der Überschuskomponenten im Sinne einer Materialbilanz liess sich kaum durchführen, da verschiedentlich nicht umgesetztes Material wieder isoliert und ein zweites Mal eingesetzt wurde, andererseits aber bei Optimierungsversuchen verloren ging.

**8. Enzymatische Spaltungen.** – Die freien Oligonucleotide wurden durch Spaltungen mittels Phosphodiesterase I, II oder alkalischer Phosphatase charakterisiert. Die Ergebnisse der Bestimmung der Komponentenverhältnisse sind in *Tabelle 3* (s. exper. Teil) zusammengestellt. *Figur 7* und *8* (s. exper. Teil) zeigen die Trennungen der Spaltprodukte von d(G-A-T-T-T) bzw. (G-A-T-T-T-G-A) mittels Hochdruckflüssigchromatographie an *Nucleosil 5SB*. Im Laufe der Untersuchungen des octameren Endproduktes wurde festgestellt, dass das verwendete Enzympräparat Nebenaktivitäten aufwies, die zu Spaltprodukten führten, die unter den gewählten HPLC.-Bedingungen eine Retentionszeit aufwiesen, die praktisch gleich

gross war wie diejenige von Desoxyguanosin. Der erhaltene Anteil an Desoxyguanosin ist deshalb zu gross und die Werte der Nucleotide sind etwas zu klein.

**9. Schlussbemerkungen.** – Im Verlaufe der Synthese haben wir immer wieder feststellen müssen, dass keine der verwendeten Schutzgruppen den Anforderungen völlig genügt. Insbesondere die Monomethoxytritylgruppe erwies sich unter den Kondensations- und Aufarbeitungsbedingungen als relativ empfindlich. Beim Arbeiten mit wässrigen Lösungen war daher eine häufige pH-Kontrolle und nötigenfalls eine pH-Korrektur durch Zugabe von Pyridin notwendig. Das gewählte Syntheseverfahren mit aufeinanderfolgender Addition von Dinucleotiden bewährte sich. Es ermöglichte, diese im Überschuss eingesetzten Komponenten auf jeder Stufe zu einem grossen Teil wieder zurückzugewinnen. Trennprobleme waren im allgemeinen gut lösbar. Grössere Schwierigkeiten traten erst bei der Synthese des geschützten bzw. freien octameren Endproduktes auf, das möglicherweise von Resten der hexameren Vorstufe verunreinigt ist. Hier wurde am deutlichsten erkennbar, dass Trennleistung und Belastbarkeit von *DEAE*-Ionenaustauscher-Säulen sehr begrenzt sind.

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

#### Experimenteller Teil

*I. Allgemeines.* Pyridin (*puriss. p.a.*) der Firma *Fluka AG*, Buchs, wurde über Bariumoxid oder Calciumhydrid destilliert und über Molekularsieb 4 Å (*Union Carbide*) aufbewahrt. – Die UV.-Spektren wurden mit einem *Beckmann*-UV.-Spektrophotometer, Modell 25, aufgenommen. – Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel der Firma *Merck*, Darmstadt, Korngrösse 0,05–0,2 mm, verwendet. Die Ionenaustauscherchromatographie erfolgte an *DEAE-Sephadex A-25*, Gelchromatographie an *Sephadex G-10* oder *G-25 medium* der Firma *Pharmacia Fine Chemicals*, Uppsala, und für die analytische Papierchromatographie wurde Papier *Whatman* No. 1 oder 3MM verwendet. – Zur Dünnschichtchromatographie wurden DC.-Fertigplatten Kieselgel 60F 254, Schichtdicke 0,25 mm, der Firma *Merck* benützt. Die Substanzflecken auf den Dünnschichtchromatogrammen (DC.) wurden im UV.-Licht oder durch Besprühen mit 10proz. Perchlorsäure und anschliessendem Erhitzen sichtbar gemacht. – Es wurden folgende Fliessmittelsysteme verwendet (*v/v*): *A*: Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser 7:1:2; *B*: Äthanol/1M Ammoniumacetat; *C*: Propanol/konz. Ammoniak/Wasser 55:10:35; *D*: Isobuttersäure/konz. Ammoniak/Wasser 66:1:33; *E*: Chloroform/Äthanol 95:5; *F*: Butanol/Essigsäure/Wasser 5:2:3. – Zur Überführung von Nucleotiden in das Pyridiniumsalz sowie zur Neutralisierung von alkalischen Hydrolysegemischen wurde der saure Kationenaustauscher *Dowex 50W×8*, 20–50 mesh (1,9 mÄquiv./ml.), der Firma *Fluka* verwendet, der mit einem Überschuss an Pyridin in die Pyridiniumform übergeführt wurde. Sämtliche Ionenaustausch-Reaktionen mit *Dowex* wurden in Gegenwart von mindestens 20% Pyridin durchgeführt (pH-Kontrolle). – Das Eindampfen von wässrigen Lösungen erfolgte i.RV. bei 30–35°/14 Torr unter häufiger Zugabe von Pyridin, womit Schaumbildung teilweise verringert wurde. – Zur Ionenaustauschchromatographie wurde Ammoniumhydrogencarbonat der Firma *BDH*, England, Typ *AnalaR*, verwendet. – Bei der analytischen Hoch-

druckflüssigchromatographie (HPLC.) wurde eine  $0,4 \times 30$ -cm-Säule mit dem Anionenaustauschermaterial *Nucleosil 5 SB* eingesetzt. Die dazu verwendeten Geräte stammten von *Instrumentation Specialties Company (ISCO)*: Dialagrad *ISCO* Modell 384, Absorbance-Monitor *ISCO* Modell UA-5, Optical Unit Type 6, Hochdruckpumpe *ISCO*. Die quantitative Auswertung erfolgte mit einem Integrator HP 3380A. Bei der HPLC. von ungeschützten Oligonucleotide wurden folgende Apparaturen und Materialien eingesetzt:  $0,4 \times 30$ -cm-Säule mit *Nucleosil 10 C<sub>8</sub>* (*hplc Technology Ltd., Mercatura, Basel*), *Philips PYE UNICAM LC-XP* Gradientenprogrammierer und Lösungsmittelmischer, Pumpe *Altex*, Modell 100 (*Philips PYE UNICAM LC-XPD*), Absorbance-Monitor und Optical Unit Type 6 von *Instrumentation Specialties* (s. oben) und Triäthylamin *puriss. p.a.* (No. 90340) sowie Acetonitril für HPLC. (No. 00692) von *Fluka AG*, Buchs. – Alle Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) wurden durch Addition der entsprechenden Werte der monomeren Bausteine berechnet und jegliche Hypochromieeffekte vernachlässigt. – Für die enzymatischen Spaltungen wurden folgende Enzyme eingesetzt: Schlangengiftphosphodiesterase (E.C.3.1.4.1., *Venom Phosphodiesterase I, Crotalus adamanteus, Worthington Biochemical Corporation* (No. 3926) oder *Merck AG* (No. 25002)), Milzphosphodiesterase (E.C.3.1.4.1., *Phosphodiesterase II, Bovine Spleen, PL-Biochemical Inc.* (No. 0606)) und alkalische Phosphatase (E.C.3.1.3.1., *Escherichia coli, Worthington Biochemical Corporation*). – Sämtliche Produkte wurden lyophilisiert, ausgefällt oder in wässriger Lösung bei  $-20$  bis  $-30^\circ$  aufbewahrt. – Beim Eindampfen der Reaktanten mit absolutem Pyridin i.HV. wurde jeweils mit Stickstoff, der durch konz. Schwefelsäure und Phosphorpentoxid (*Sicapent, Merck*) geleitet wurde, oder besser mit Argon entlüftet. – Für weitere apparative Details s. [7]. – Die Bestimmung der Ausbeuten erfolgte in den meisten Fällen auf spektroskopischem Weg, d.h. durch Angabe von OD.-Einheiten (1 OD.-Einheit = Menge Substanz, die in 1 ml Lösung in einer 1-cm-Zelle eine Absorption von 1,0 ergibt). Als Bezugswellenlänge wurde  $\lambda = 265$  nm gewählt, da alle Produkte bei diesem Wert relativ stark absorbieren oder gar ein Maximum aufweisen.

$N^2$ -Isobutyryl-5'-O-monomethoxytrityl-2'-desoxyguanosin ( $d[(MeOTr)ibG]$ ) wurde nach [2] hergestellt. Als Fließmittel bei der Chromatographie an Kieselgel diente Methylchlorid mit steigendem Gehalt an Methanol. Nach der Isobutyrylierung von dG, der alkalischen Hydrolyse und der Einführung der Monomethoxytritylgruppe wurde  $d[(MeOTr)ibG]$  in einer Gesamtausbeute von 60% erhalten. – UV. (Äthanol):  $\epsilon_{265} = 14'250$ ,  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 0,84$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 0,90$ ,  $\epsilon_{260}/\epsilon_{280} = 1,30$ .

3'-O-Acetyl- $N^6$ -benzoyl-2'-desoxyadenosin-5'-phosphat ( $d[pbzA(Ac)]$ ) und 3'-O-Acetyl-2'-desoxyribosylthymine-5'-phosphat ( $d[pT(Ac)]$ ) wurden nach [17] hergestellt. Die Benzoylierung von dpA erfolgte nach [21]. – UV. (Wasser): a)  $dpbzA$ :  $\epsilon_{280} = 20,700$ ,  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 1,57$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 1,10$ ; b)  $dpT$ :  $\epsilon_{265} = 9800$ ,  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 0,66$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 3,69$ . – Die Isolierung der acetylierten Produkte erfolgte entweder durch Ausfällen in Äther oder durch Lyophilisieren der wässrigen Reaktionslösung.  $d[pbzA(Ac)]$  und  $d[pT(Ac)]$  wurden in quantitativer Ausbeute erhalten.

2'-Desoxyribosylthymine-5'-( $\beta$ -cyanoäthyl)phosphat ( $d[(CNEt)pT]$ ) wurde durch Umsetzung von dpT mit einem 65fachen Überschuss an Cyanoäthanol (3-Hydroxypropionitril) nach der Vorschrift von *Khorana et al.* [17] in einer Ausbeute von 70% erhalten. Die Auftrennung des Gemischs erfolgte an *DEAE-Sephadex* mit einem wässrigen Gradienten an Ammoniumhydrogencarbonat, wobei  $d[(CNEt)pT]$  bei einer Pufferkonzentration von 0,03M eluiert wurde. Die Isolierung des Produktes erfolgte durch Lyophilisieren aus wässriger Lösung. – UV. (Wasser):  $\epsilon_{265} = 9800$ ,  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 0,59$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 3,70$ .

$N^2$ -Isobutyryl-2'-desoxyguanosin-5'-( $\beta$ -cyanoäthyl)phosphat ( $d[(CNEt)ibG]$ ) wurde im wesentlichen nach [17] und [19] hergestellt. dpG und dpibG wurden durch 2stdg. Rühren mit einem 50fachen Überschuss an Pyridinium-*Dowex* in die Pyridiniumform übergeführt. Bei 9% der eingesetzten Menge wurden auf diese Weise im Falle von dpG die Natrium-ionen nicht ausgetauscht. Das in Pyridin schwerlösliche Natriumsalz wurde deshalb über eine Glasfritte angetrennt. Bei der Cyanoäthylierung von dpibG wurde ein 65facher Überschuss an Cyanoäthanol eingesetzt. Die Auftrennung des Reaktionsgemisches bei der Herstellung von dpibG und  $d[(CNEt)pibG]$  erfolgte wie bei  $d[(CNEt)pT]$  durch Chromatographie an *DEAE-Sephadex* und anschliessendes Lyophilisieren der wässrigen Lösung. dpibG und  $d[(CNEt)pibG]$  wurden in einer Ausbeute von 87 bzw. 68% erhalten. – UV. (Wasser): a)  $dpibG$ :  $\epsilon_{265} = 15'640$ ,  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 0,79$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 3,16$ ,  $\epsilon_{258}/\epsilon_{227} = 4,74$ ; b)  $d[(CNEt)pibG]$ :  $\epsilon_{265} = 15'640$ ,  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 2,20$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 2,80$ ,  $\epsilon_{258}/\epsilon_{226} = 4,89$ .

2. Herstellung von  $N^2$ -Isobutyryl-5'-O-monomethoxytrityl-2'-desoxyguanylyl-[3'-5']- $N^6$ -benzoyl-2'-desoxyadenosin ( $d[(MeOTr)ibGpbzA]$ ). Ein Gemisch von 260 mg (0,426 mmol)  $d[(MeOTr)ibG]$  und 258 mg (0,464 mmol)  $d[pbzA(Ac)]$  (Pyridiniumsalz) wurde 24 Std. i.HV. bei RT. getrocknet. Die Kon-



densation wurde durch Zugabe von 8,5 ml Pyridin und 964 mg (4,67 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Gang gesetzt. Nach 5 Tagen Rühren im Dunkeln bei RT. wurde mit 8,5 ml Wasser versetzt, nach 5 Std. abgenutscht und der Niederschlag mit 60 ml 50proz. Pyridin gewaschen. Das Filtrat wurde unter häufiger Zugabe von Pyridin eingedampft, auf 400 ml einer 15proz. Pyridinlösung verdünnt und mit 400 ml Äther/Pentan 4:1 ausgeschüttelt. Der organische Extrakt wurde 2mal mit 200 ml 10proz. Pyridin nachgewaschen, die wässrigeren Phasen wurden vereinigt, unter Zugabe von Pyridin zu 10 ml einer konz. Lösung in Pyridin eingeeengt und mit 10 ml Wasser versetzt. Zu dieser auf 0° gekühlten Lösung wurden 20 ml vorgekühltes 2N NaOH gegeben. Die auftretende Trübung konnte auch durch Zugabe von 2 ml Äthanol nicht vollständig beseitigt werden. Nach 15 Min. Hydrolyse wurde das Gemisch mit 39 ml Pyridinium-Dowex neutralisiert. Nach Abfiltrieren von Dowex über eine Säule, Nachwaschen mit 200 ml 20proz. Pyridin und 200 ml 50proz. Äthanol wurde das wässrige Filtrat unter häufiger Zugabe von Pyridin auf 40 ml einer 10proz. Pyridinlösung eingeeengt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100 × 1 cm, Hydrogencarbonatform) aufgetragen. Linearer Elutionsgradient: 3 Liter 50proz. Äthanol im Mischgefäß, 3 Liter 0,1M Ammoniumhydrogencarbonat in 50proz. Äthanol im Vorratsgefäß. Fraktionen zu 23 ml, gesammelt in je 15 Min.:

Fr. Nr.	Konz. von NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Substanz	OD <sub>280</sub>	Ausbeute [%]
60–70	0,025M	d[(MeOTr)ibGpbzA]	6460	53
178–189	0,07M	d(pbzA)	1800	20
190–200	0,075M	d(A5'pp5'A) vermischt	968	10

Die Fraktionen 60–70 (0,226 mmol, 53%) wurden unter Zugabe von Pyridin eingedampft und durch Lyophilisieren aus einer Lösung von 10–15% Pyridin als farbloses, trockenes Pulver erhalten (214 mg; 0,21 mmol, 48%). Im DC. (A, F) erwies sich das Produkt als leicht verunreinigt (Spur von d(ibGpbzA)). – UV. (50proz. Äthanol): max. 278, 260, 232; min. 245, 267;  $\epsilon_{265} = 27420$ ,  $\epsilon_{280} = 28520$ ;  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 1,04$ ;  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 0,98$ .

3. *Herstellung von 5'-O-Phosphoryl-2'-desoxyribosylthymylyl-[3'-5']-2'-desoxyribosylthymidin (d(pTpT))*. Eine wässrige Lösung von d[(CNEt)pT] (40'545 OD<sub>265</sub>, 4,137 mmol, Ammoniumsalz) wurde mit 35 ml Pyridinium-Dowex  $\frac{1}{2}$  Std. gerührt. Nach Abfiltrieren von Dowex, Einengen und Lyophilisieren wurde das schaumartige, stark hygroskopische Pyridiniumsalz erhalten. Nach Zugabe von 1,854 g (4,2 mmol) d[pT(Ac)] (Pyridiniumsalz) wurden die beiden Komponenten 4mal i. HV. mit 4 ml abs. Pyridin zu einem viskosen Rückstand eingedampft. Die Kondensation wurde mit 9 g (43 mmol) DCC in 30 ml Pyridin unter Rühren im Dunkeln während 5 Tagen durchgeführt. Nach der üblichen Aufarbeitung (s. [17]) wurde das wässrige Gemisch auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100 × 2 cm, Hydrogencarbonatform) aufgetragen. Linearer Eluierungsgradient: 6 Liter Wasser im Mischgefäß, 6 Liter 0,22M Ammoniumhydrogencarbonat im Vorratsgefäß. Fraktionen zu 24 ml, gesammelt in je 8 Min. d(pTpT) wurde bei einer Pufferkonzentration von 0,16–0,19M eluiert und in einer Ausbeute von 55% erhalten. Das Produkt wurde durch Lyophilisieren aus Wasser als farbloses Pulver isoliert. – UV. (Wasser): max. 266, min. 233;  $\epsilon_{265} = 19'600$ ,  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 0,59$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 3,73$ .

4. *Herstellung von N<sup>2</sup>-Isobutyryl-5'-O-phosphoryl-2'-desoxyguanylyl-[3'-5']-N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-desoxyadenosin (d(pibGpbzA))*. Zu einer wässrigen Lösung von d[(CNEt)pibG] (1265 OD<sub>258</sub>, 0,073 mmol) wurden 4 ml Pyridinium-Dowex gegeben und 2 Std. gerührt. Nach Abfiltrieren von Dowex und langsamem Nachwaschen (350 ml 10proz. Pyridin) wurde die Lösung eingeeengt und lyophilisiert. Nach Zugabe von 45 mg (0,081 mmol) d[pbzA(Ac)] (Pyridiniumsalz) wurden die beiden Komponenten 4mal mit 3 ml abs. Pyridin i. HV. eingedampft. Die Kondensation wurde mit 70 mg (0,23 mmol) Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS) in 0,3 ml Pyridin während 4 Std. unter Rühren im Dunkeln durchgeführt. Dann wurden unter Kühlung bei –78° 0,48 ml 1M Lösung von Diisopropyläthylamin in Pyridin, 3,2 ml Pyridin und 4 ml Wasser zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei RT. stehengelassen, nach Verdünnen mit 50proz. Pyridin auf 10 ml auf 0° abgekühlt und mit 10 ml vorgekühlten 2N NaOH versetzt (eine klare Lösung wurde erst mit zusätzlichen 0,5–1 ml Wasser erhalten). Die Hydrolyse dauerte 10 Min. bei 0°. Neutralisiert wurde mit 16 ml Pyridinium-Dowex unter Rühren. Nach Abfiltrieren und langsamem Nachwaschen (400 ml 10proz. Pyridin) wurde die wässrige Lösung unter Zugabe von Pyridin auf 20 ml eingeeengt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100 × 1 cm, Hydrogencarbonatform) gebracht. Linearer Eluierungsgradient: 3 Liter Wasser im Mischgefäß, 3 Liter 0,22M Ammoniumhydrogencarbonat im Vorratsgefäß. Fraktionen zu 23 ml, gesammelt

in je 15 Min. Die Fraktionen 118–122 enthielten d(pibG), Fr. 124–127 (mit 0,105M Ammoniumhydrogencarbonat) d(pbzA). Die beiden Mononucleotide waren jedoch unter diesen Bedingungen nicht trennbar. Fr. 130–135 enthielten das Pyrophosphat d(bzA5'pp5'bzA). Das Hauptprodukt d(pibGpbzA) wurde bei Fr. 177–188 (mit 0,155M Ammoniumhydrogencarbonat) eluiert und in einer Menge von 741 OD.<sub>265</sub> (0,025 mmol, 35%) erhalten. Die Gewichtsausbeute betrug 24 mg (37%). Das Produkt war im DC. (A, B, F) einheitlich. – UV. (Wasser): max. 279, 258; min. 267, 229;  $\epsilon_{265} = 28'810$ ,  $\epsilon_{280/265} = 1,10$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 167$ .

5. 3'-O-Acetylierung von d(pTpT) und d(pibGpbzA). Die aus wässriger Lösung lyophilisierten Pyridiniumsalze von d(pTpT) und d(pibGpbzA) wurden 4 Std. mit einem 50fachen Überschuss an Essigsäureanhydrid in Pyridin (4faches Volumen bezüglich Essigsäureanhydrid) im Dunkeln bei RT. umgesetzt. Anfänglich vorhandene, suspensionsartige oder lackartige Rückstände gingen im Verlauf der Reaktion vollständig in Lösung. Das Gemisch wurde darauf unter Eiskühlung mit Methanol (2faches Volumen bezüglich Essigsäureanhydrid) versetzt und 2 Std. bei RT. stehengelassen. Nach Zugabe von Wasser (2faches Volumen bezüglich Methanol) unter Eiskühlung wurde über Nacht für d[pTpT(Ac)] bei RT. bzw. für d[pibGpbzA(Ac)] bei 0° zu Ende hydrolysiert. Nach Einengen und mehrmaligem Lyophilisieren wurden die farblosen Pulver von d[pTpT(Ac)] und d[pibGpbzA(Ac)] in quantitativer Ausbeute erhalten. – UV. (Wasser): Überlagerung mit dem Spektrum von Pyridin. a) d[pTpT(Ac)]: max. 260, min. 232;  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 0,56$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 2,93$ ; b) d[pibGpbzA(Ac)]: max. 277, 256; min. 269, 227;  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 0,96$ ,  $\epsilon_{285}/\epsilon_{235} = 1,60$ .

6. Herstellung von N<sup>2</sup>-Isobutyryl-5'-O-monomethoxytrityl-2'-desoxyguanylyl-[3'-5']-N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-desoxyadenylyl-[3'-5']-2'-desoxyribosylthymylyl-[3'-5']-2'-desoxyribosylthymine (d[MeOTr]ibGpbzApTpT). Eine Lösung von 504 mg (0,433 mmol) d[(MeOTr]ibGpbzA) (Ammoniumsalz) in Wasser/Pyridin 7 : 3 wurde mit 12 ml Pyridinium-Dowex 30 Min. bei RT. gerührt. Nach Abfiltrieren von Dowex über eine Säule, Nachwaschen mit 250 ml 25proz. Pyridin und 250 ml 50proz. Äthanol wurde die Lösung mit Pyridin eingengt und lyophilisiert. Nach Zugabe von 538 mg (0,651 mmol) d[pTpT(Ac)] (Pyridiniumsalz) wurden die beiden Komponenten 3mal mit 5 ml Pyridin i. HV. eingedampft (dickflüssiges Öl). Die Kondensation wurde in 10 ml Pyridin mit 1,158 g (3,822 mmol) TPS unter 5 Std. Rühren im Dunkeln bei RT. durchgeführt. Nach Zugabe von 7,8 ml 1M Lösung von Diisopropyläthylamin in Pyridin wurde unter Kühlung bei –78° mit 18,8 ml Wasser hydrolysiert, über Nacht bei RT. stehengelassen und dann mit 50proz. Pyridin auf 50 ml verdünnt. Nach Abkühlen auf 0° wurden 50 ml vorgekühltes 2N NaOH zugegeben. Die Hydrolyse dauerte 15 Min. bei 0°. Neutralisiert wurde mit 85 ml Pyridinium-Dowex. Nach Abfiltrieren von Dowex und langsamem Nachwaschen (250 ml 25proz. Pyridin, 250 ml 50proz. Äthanol) wurde die wässrige Lösung mit Pyridin (pH-Kontrolle) auf ca. 50 ml eingengt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100×1 cm, Hydrogencarbonatform) aufgetragen. Linearer Eluierungsgradient: a) 2 Liter Wasser im Mischgefäß, 2 Liter 0,3M Ammoniumhydrogencarbonat im Vorratsgefäß; b) Zurückwaschen mit 450 ml Wasser; c) 2 Liter 50proz. Äthanol im Mischgefäß, 2 Liter 0,3M Ammoniumhydrogencarbonat in 50proz. Äthanol im Vorratsgefäß. Fraktionen zu 23 ml, gesammelt in je 15 Min.:

Fr. Nr.	Gradient	Konz. von NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Substanz	OD. <sub>265</sub>	Ausbeute [%]
30	a)	0,05M	TPS-OH		
92–107	a)	0,16–0,19M	d[pTpT]	5520	43
20	c)	0,03M	d[(MeOTr]ibGpbzA]		
75–100	c)	0,13–0,17M	d[(MeOTr]ibGpbzApTpT]	8249	41
124	c)	0,22M	d(TpT5'pp5'TpT)		

Fr. 75–100, erhalten unter Bedingung c), enthielten 5520 OD.<sub>265</sub> (0,178 mmol) und wurden nach Einengen mit Pyridin lyophilisiert (Lösung in Wasser/Pyridin 95 : 5 bis 90 : 10). Die Gewichtsausbeute betrug 330 mg (0,196 mmol, 45%). Das Produkt erwies sich im DC. (A, B, F) als rein und zeigte die charakteristische Gelbfärbung beim Besprühen mit 10proz. Perchlorsäure. – UV. (50proz. Äthanol): max. 260–272 br., min. 238 br.;  $\epsilon_{265} = 47040$ ,  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 0,91$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 1,43$ . – UV. (Wasser):  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 0,86$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 1,41$ .

7. Herstellung von N<sup>2</sup>-Isobutyryl-5'-O-monomethoxytrityl-2'-desoxyguanylyl-[3'-5']-N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-desoxyadenylyl-[3'-5']-2'-desoxyribosylthymylyl-[3'-5']-2'-desoxyribosylthymylyl-[3'-5']-2'-desoxyribosylthymine (d[MeOTr]ibGpbzApTpTpT). Zu einer wässrigen Lösung

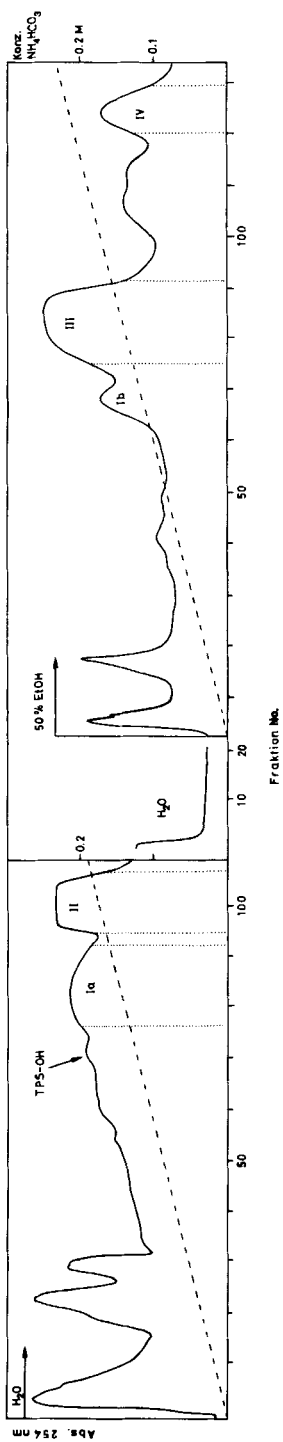


Fig. 1. Kondensation von  $d[(MeOTr)ibGpbzA]$  mit  $d[pTpT]$ . Trennung der Reaktionsprodukte an DEAE-Sephadex. Spitzen Ia und Ib enthielten  $d[(MeOTr)ibGpbzA]$ , Spitze II  $d[pTpT]$ , Spitze III  $d[(MeOTr)ibGpbzApTpT]$  und Spitze IV das symmetrische Pyrophosphat von  $d(pTpT)$ .

von 50 mg (26,2  $\mu\text{mol}$ , 1250  $\text{OD}_{265}$ )  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpT}]$  in 30proz. Pyridin wurden 5 ml Pyridinium-*Dowex* gegeben und 45 Min. bei RT. gerührt. Nach Abfiltrieren von *Dowex*, Nachwaschen mit 150 ml 20proz. Pyridin und 150 ml 50proz. Äthanol wurde die wässrige Lösung unter häufiger Zugabe von Pyridin eingeengt und lyophilisiert. Nach Zugabe von 107 mg (130  $\mu\text{mol}$ )  $d[\text{pTpT}(\text{Ac})]$  (Pyridiniumsalz) wurden die beiden Komponenten i.HV. 3mal mit 4 ml Pyridin zu einem lackartigen Rückstand abgedampft. Die Kondensation wurde in 0,8 ml Pyridin mit 141 mg (0,468 mmol) TPS unter Rühren im Dunkeln während 5 Std. durchgeführt. Das Gemisch wurde dann mit einer Kältemischung von  $-78^\circ$  gekühlt, mit 0,94 ml 1M Lösung von Diisopropyläthylamin in Pyridin und 10 ml Wasser versetzt und über Nacht bei  $3^\circ$  stehengelassen. Dann wurde mit 50proz. Pyridin auf 25 ml verdünnt, auf  $0^\circ$  gekühlt und mit 25 ml vorgekühltem 2M NaOH versetzt. Die Hydrolyse dauerte 12 Min. bei  $0^\circ$ , wobei nach 2 Min. durch Zugabe von 2 ml Äthanol eine klare Lösung erhalten wurde. Das Gemisch wurde mit 37 ml Pyridinium-*Dowex* neutralisiert, vom *Dowex* abfiltriert, welches mit 150 ml 20proz. Pyridin und 150 ml 50proz. Äthylalkohol langsam nachgewaschen wurde, das Filtrat unter Zugabe von Pyridin eingeengt und auf eine *DEAE-Sephadex*-Säule ( $100 \times 1$  cm, Hydrogencarbonat) aufgetragen. Linearer Eluierungsgradient: a) 2 Liter Wasser im Mischgefäß, 2 Liter 0,3M Ammoniumhydrogencarbonat im Vorratsgefäß; b) Zurückwaschen mit 250 ml Wasser; c) 1,5 Liter 50proz. Äthylalkohol im Mischgefäß, 1,5 Liter 0,6M Ammoniumhydrogencarbonat in 50proz. Äthylalkohol im Vorratsgefäß. Fraktionen zu 23 ml, gesammelt in je 15 Min:

Fr. Nr.	Gradient	Konz. von $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	Substanz	$\text{OD}_{265}$	Ausbeute [%]
40	a)	0,07M	TPS-OH		
72–83	a)	0,125–0,14M	$d[\text{pTpT}]$	1152	45
28–32	c)	0,13 –0,145M	$d[\text{pTpT}(\text{Ac})]$	140	11
43–47	c)	0,19 –0,21M	Pyrophosphat von $d[\text{pTpT}(\text{Ac})]$	258	10
51–60	c)	0,24 –0,28M	$d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpT}]$	600	35

Die Fraktionen 51–60, erhalten unter Bedingung c), enthielten 9  $\mu\text{mol}$   $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpT}]$ , das mit einer Spur enttrityliertem Produkt verunreinigt war (DC. in A, C, F). Lyophilisieren aus wässriger Lösung mit 10proz. Pyridin lieferte farbloses Pulver. – UV. (50proz. Äthanol): max. 263, min. 232;  $\epsilon = 66620$ ,  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 0,83$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 1,73$ .

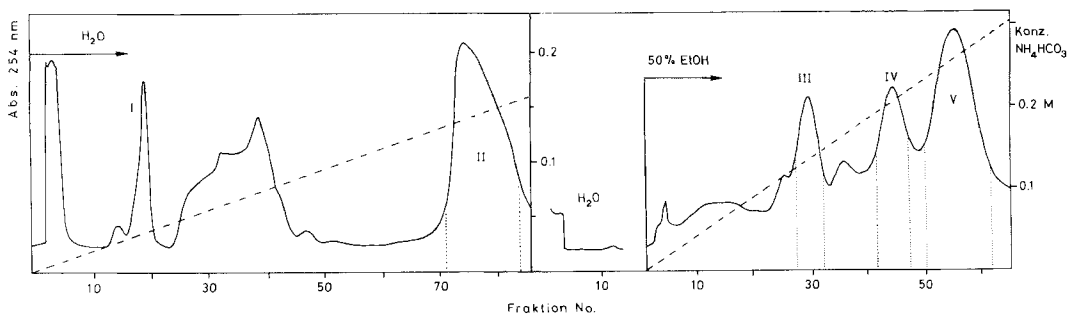


Fig. 2. Kondensation von  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpT}]$  mit  $d[\text{pTpT}(\text{Ac})]$ . Trennung der Reaktionsprodukte an *DEAE-Sephadex*. Spitze I enthält TPS, Spitze II  $d[\text{pTpT}]$ , Spitze III  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpT}]$ , Spitze IV das symmetrische Pyrophosphat von  $d[\text{pTpT}]$  und Spitze V  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpT}]$ . Mit dem Gradienten in 50proz. Äthylalkohol konnte erst nach der Eluierung des Pyrophosphats begonnen werden.

8. Herstellung von  $\text{N}^2$ -Isobutyrylyl-5'-O-monomethoxytrityl-2'-desoxyguanylyl-[3'-5']-N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-desoxyadenylyl-[3'-5']-2'-desoxyribosylthymylyl-[3'-5']-2'-desoxyribosylthymylyl-[3'-5']-2'-desoxyribosylthymylyl-[3'-5']-2'-desoxyribosylthymylyl-[3'-5']-N<sup>2</sup>-isobutyryl-2'-desoxyguanylyl-[3'-5']-N<sup>6</sup>-benzoyl-

2'-desoxyadenosin ( $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpT}\text{pibGpbzA}]$ ). Zu einer wässrigen Lösung von 330 OD<sub>265</sub> (5  $\mu\text{mol}$ )  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpT}]$  in 50proz. Pyridin wurden 2 ml Pyridinium-Dowex gegeben. Nach 25 Min. Rühren bei RT., Abfiltrieren von Dowex, langsamem Nachwaschen mit 150 ml 50proz. Pyridin und Einengen der Lösung mit Pyridin wurde lyophilisiert (Lösung in Wasser/Pyridin 9:1). Nach Zugabe von 51 mg (50  $\mu\text{mol}$ )  $d[\text{pibGpbzA}(\text{Ac})]$  (Pyridiniumsalz) wurden die beiden Komponenten i.HV. 3mal mit 3 ml Pyridin zur Trockene eingedampft. Die Kondensation erfolgte in 350  $\mu\text{l}$  Pyridin mit 42 mg (139  $\mu\text{mol}$ ) TPS unter Rühren im Dunkeln während 3,5 Std. Das Gemisch wurde bei  $-78^\circ$  gekühlt, mit 0,45 ml 1M Lösung von Diisopropyläthylamin in Pyridin, 3 ml Pyridin und 4 ml Wasser versetzt und über Nacht bei  $3^\circ$  stehengelassen. Nach Verdünnen mit 10 ml Wasser wurde die Lösung auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100  $\times$  1 cm, Hydrogencarbonatform) aufgetragen. Linearer Eluierungsgradient: 1750 ml 30proz. Äthylalkohol im Mischgefäß, 1750 ml 0,7M Ammoniumhydrogencarbonat in 30proz. Äthylalkohol im Vorratsgefäß. Fraktionen zu 23 ml, gesammelt in je 15 Min.:

Fr. Nr.	Konz. von $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	Substanz	OD <sub>265</sub>	Ausbeute [%]
30–35	0,145M	$d[\text{pibGpbzA}]$	897	63
40	0,18M	Pyrophosphat von $d(\text{pibGpbzA})$		
75–100	0,34–0,46M	$d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpT}]$	146	44
113–127	0,51–0,58M	$d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpT}\text{pibGpbzA}]$	82	17

Die Fraktionen 113–127 enthielten 0,9  $\mu\text{mol}$   $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpT}\text{pibGpbzA}]$  und wurden mit Pyridin eingedampft. Im DC. (A, F) zeigte sich eine leichte Verunreinigung. – UV. (30proz. Äthylalkohol): max. 262, min. 232;  $\epsilon_{265} = 95430$ ,  $\epsilon_{280}/\epsilon_{265} = 0,89$ ,  $\epsilon_{265}/\epsilon_{235} = 1,58$ . Das Produkt wurde nicht isoliert, sondern direkt mit konz. Ammoniak und Essigsäure behandelt.

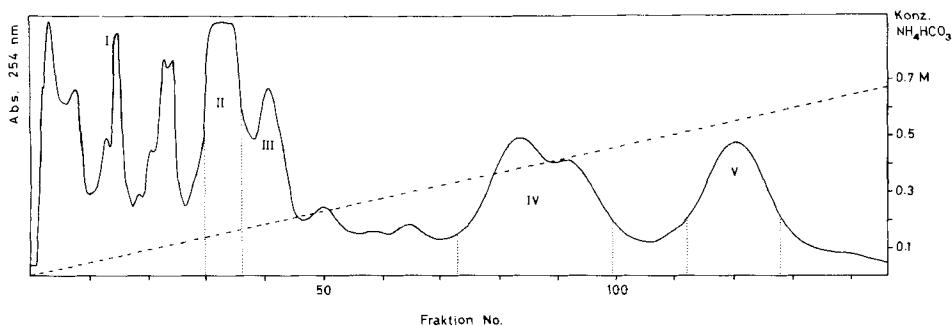


Fig. 3. Kondensation von  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpT}]$  mit  $d[\text{pibGpbzA}(\text{Ac})]$ . Trennung der Reaktionsprodukte an DEAE-Sephadex. Spitze I enthielt TPS, Spitze II  $d[\text{pibGpbzA}]$ , Spitze III das symmetrische Pyrophosphat von  $d(\text{pibGpbzA})$ , Spitze IV  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpT}]$  und Spitze V  $d[(\text{MeOTr})\text{ibGpbzApTpTpTpT}\text{pibGpbzA}]$ .

9. Abspaltung der Schutzgruppen (vgl. [17]). Die Abspaltung der N-Acyl-Schutzgruppen erfolgte bei allen Produkten durch Behandlung mit 3–4 ml konz. Ammoniak/Pyridin ca. 4 : 1 während 48 Std. bei RT. Die Monomethoxytritylgruppe wurde bis zur Hexanucleosid-pentaphosphat-Stufe mit 3–4 ml 80proz. Essigsäure während 45 Min. bei RT. und auf der Octanucleosid-heptaphosphat-Stufe mit 3–4 ml Essigsäure/Pyridin/Wasser 14 : 1 : 3 während 24 Std. bei RT. entfernt. Nach der alkalischen Hydrolyse wurde Ammoniak durch Abdampfen i. RV. entfernt, die wässrige Lösung mit Äther extrahiert und lyophilisiert. Nach der sauren Hydrolyse wurde Essigsäure durch Abdampfen i. HV. bei RT. entfernt. Die so erhaltenen Gemische wurden schliesslich an DEAE-Sephadex aufgetrennt. Zusätzlich wurde bei den Produkten  $d(\text{G-A-T-T-T})$  und  $d(\text{G-A-T-T-T-G-A})$  noch an Sephadex G-10 bzw. G-25 entsalzt. Die Ausbeute nach den auf diese Weise durchgeführten Schutzgruppen-

abspaltungen betrug je nach Produkt 60–70%. Die spektroskopischen Daten der freien Oligonucleotide sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. Spektroskopische Daten der ungeschützten Oligonucleotide

Produkt	max [nm]	$\epsilon_{265}$	$\epsilon_{280}/\epsilon_{265}$	$\epsilon_{265}/\epsilon_{235}$	Lösungsmittel
d(G-A)	255	23980	0,41	2,0	Wasser
d(pG-A)	255	23980	0,35	4,16	Wasser
d(pT-T)	266	19600	0,59	3,73	Wasser
d(G-A-T-T)	259	43580	0,55	2,16	Wasser
d(G-A-T-T-T-T)	260	63180	0,57	2,64	20proz. Äthanol
d(G-A-T-T-T-T-G-A)	258	87180	0,53	2,24	30proz. Äthanol

10. *Enzymatische Spaltungen.* Die Durchführung der Versuche erfolgte im wesentlichen nach Angaben der Literatur [27] [28]. Als Substrate wurden die Ammoniumsalze der entsprechenden Oligonucleotide eingesetzt.

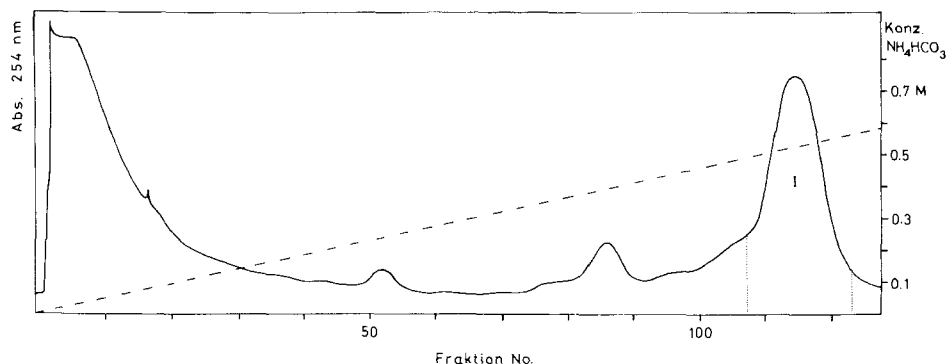


Fig. 4. Chromatographie von *d(G-A-T-T-T-G-A)* an DEAE-Sephadex

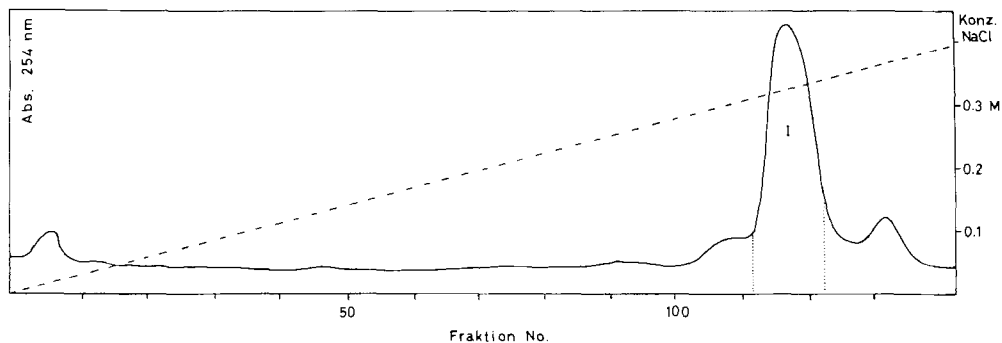


Fig. 5. Chromatographie von *d(G-A-T-T-T-G-A)* an DEAE-Sephadex in 7M Harnstoff (Säule 50 × 1 cm, Fraktionen 5 ml/20 Min., 500 ml 7M Harnstoff im Mischgefäß, 500 ml 0,5M NaCl in 7M Harnstoff im Vorratsgefäß)

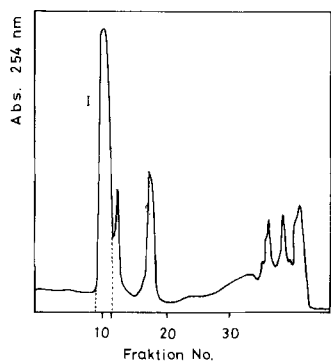


Fig. 6. Gelchromatographie von *d*(G-A-T-T-T-G-A) an Sephadex G-25 in Wasser (Säule 100 × 1 cm, Fraktionen 5 ml/20 Min.). Spitze I enthält *d*(G-A-T-T-T-G-A)

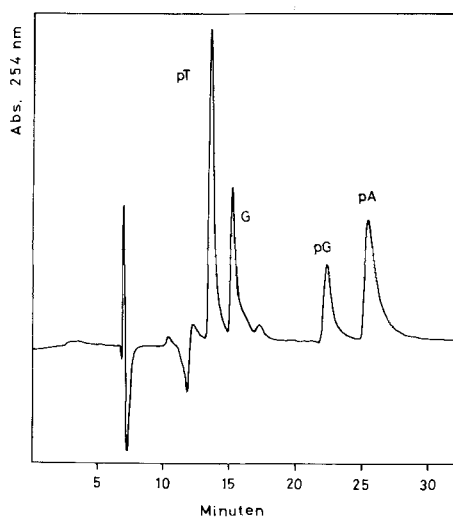


Fig. 7. Trennung der Spaltprodukte von *d*(G-A-T-T-T) an Nucleosil 5SB

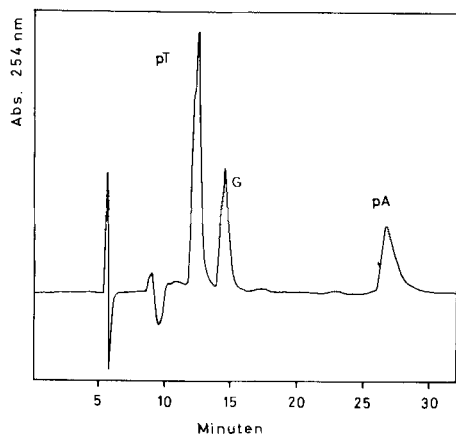


Fig. 8. Trennung der Spaltprodukte von *d*(G-A-T-T-T-G-A) an Nucleosil 5SB

Tabelle 3. *Enzymatische Spaltungen*

Enzym	Substrat	Spaltprodukte	Verhältnis der Spaltprodukte	Chromatographie <sup>a)</sup>	U/ $\mu\text{mol}^{\text{b)}$
Phosphodiesterase I	d[G-A]	dG, pA	0,9 : 1,0	PC.	10
	d[pG-A]	dpG, dpA	1,0 : 0,9	PC.	19
	d[pT-T]	dpT			11
	d[G-A-T-T]	dG, dpA, dpT	1,3 : 1,0 : 2,0	PC. <sup>c)</sup>	19
	d[G-A-T-T-T]	dG, dpA, dpT	1,1 : 1,0 : 4,0	PC.	43
	d[G-A-T-T-T-G-A]	dG, dpA, dpT, dpG	1,0 : 1,1 : 4,0 1,2 : 1,7 : 4,0 : 0,8	HPLC. HPLC.	43 55
Phosphodiesterase II	d[G-A]	dGp, dl <sup>d)</sup>	0,9 : 1,0	PC.	0,65
Alkalische Phosphatase	d[pT-T]	d[T-T]		DC.	1,1
	d[T5'pp5'T]	dpT		DC.	

<sup>a)</sup> Trennung der Spaltprodukte entweder mittels Papierchromatographie (PC.), Dünnschichtchromatographie (DC.) oder Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC.).

<sup>b)</sup> Anzahl Enzym-Einheiten U pro  $\mu\text{mol}$  Substrat in Inkubationslösung.

<sup>c)</sup> Werte von dpT und dpA zu niedrig, da diese Spaltprodukte 2mal aus Papier eluiert werden mussten.

<sup>d)</sup> Käufliche Phosphodiesterase II besitzt eine Desaminase-Aktivität [39].



*Enzymlösungen.* Eine Lösung von 100–125 Einheiten der Phosphodiesterase aus Schlangengift (von *Worthington Biochemical Corporation*) in 2 ml 0,33M Trispuffer (pH 9,1) wurde bei 0° aufbewahrt. – Eine Lösung von 25 Einheiten der Phosphodiesterase aus Schlangengift (von *Merck AG*) in 2 ml 0,33M Trispuffer (pH 9,1) wurde bei 0° aufbewahrt. – Eine Lösung von 13–18 Einheiten der Phosphodiesterase aus Milz in 2 ml 0,2M Ammoniumacetat-Puffer (pH 5,7) wurde bei 0° aufbewahrt. – Zur Herstellung der Lösung von alkalischer Phosphatase s. [6].

*Substratlösungen.* Es wurden Substratlösungen mit 0,14–0,5 µmol Oligonucleotid pro 30 µl Wasser verwendet. Im Falle von d(G-A-T-T-T-T-G-A) enthielten die Lösungen 0,32–0,71 nmol pro µl Wasser.

11. *Bestimmung der Komponentenverhältnisse* (vgl. Tab. 3). – a) *Mit Papierchromatographie bei d(G-A), d(pG-A), d(G-A-T-T) und (G-A-T-T-T-T)* (s. [28]). Auf Papier (*Whatman* No. 1 oder 3LM) wurden 50–60 µl Reaktionslösung in folgenden Fließmittel-Systemen chromatographiert: bei d(G-A), in *A* auf *Whatman* No. 3MM, bei d(pG-A) in *D* auf *Whatman* No. 1, bei d(G-A-T-T) in *A* und *D* auf *Whatman* No. 1 sowie bei d(G-A-T-T-T-T) in *A* und *D* auf *Whatman* No. 1. Bei d(G-A-T-T) und d(G-A-T-T-T-T) trennte *A* d(G) von d(pA) und d(pT); die Trennung der Nucleotide erfolgte anschließend in *D*. Eine spätere Untersuchung zeigte, dass diese 3 Komponenten auch direkt in *B* getrennt werden können. Alle Spaltprodukte wurden mit Wasser aus dem Papier eluiert.

b) *Mit HPLC. bei d(G-A-T-T-T-T) und d(G-A-T-T-T-T-G-A)*. Mit einer 10 µl-Spritze wurde 4–5mal ein bestimmtes Volumen der Inkubationslösung, das 0,5–1 nmol des ursprünglich vorhandenen Oligonucleotids enthält, eingespritzt. Die Inkubationslösungen wurden zu diesem Zweck mit Wasser entsprechend verdünnt. Nach der Trennung der Komponenten auf *Nucleosil 5SB* wurde von den entsprechenden, vom Integrator ermittelten Pikflächen der Durchschnitt berechnet. In der gleichen Weise wurde mit Standardlösungen der einzelnen Komponenten, deren Konzentration UV-spektroskopisch bestimmt wurde, verfahren. Auf dieser Basis wurden somit die molaren Komponentenverhältnisse der Inkubationslösungen bestimmt. Experimentelle Bedingungen: Säule: 0,4 × 30 cm, *Nucleosil 5SB*. Eluierungsmittel: 0,6M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 4,1 (bidest. Wasser wurde über eine Fritte D4 filtriert und durch 15min. Evakuieren i. RV. entgast). Eluierungsgeschwindigkeit: 25–40 ml/Std. Druck: 110–165 bar. UV.-Detektion: bei 254 nm.

12. *Hochdruckflüssigchromatographie der freien Oligonucleotide an Nucleosil 10 C<sub>8</sub>*. Von den in Wasser gelösten Produkten wurden Portionen von wenigen Mikrolitern (ca. 0,4 µmol) mit einer 10-µl-Spritze eingespritzt. Als Fließmittel diente eine wässrige Lösung von 0,1M Triäthylammoniumacetat (s. [26]), pH 7,0, mit steigendem Gehalt an Acetonitril. Beide Fließmittel wurden durch dauerndes Einleiten von Helium entgast. Das zur Herstellung der Salzlösung verwendete bidestillierte Wasser wurde zuvor über eine Fritte D4 filtriert. Infolge des Eigenvolumens des Systems wies der Gradient eine Verzögerung von ca. 4,5 Min. (9 ml) auf. Fließgeschwindigkeit: 2 ml/Min.; Druck: 106–120 bar; Säule: 0,4 × 30 cm. Unter diesen Bedingungen wies die Säule eine theoretische Bodenzahl von ca. 800 auf (mit Gradient). Die Retentionszeiten der Produkte sind in *Tab. 4* zusammengestellt.

Tabelle 4. *Retentionszeiten der freien Oligonucleotide (auf Nucleosil 10 C<sub>8</sub>)*

Produkt	Retentionszeit	% Acetonitril <sup>a)</sup> im Fließmittel
d[G-A]	9,0	6
d[pG-A]	9,2	6,1
d[pT-T]	10,2	7,5
d[G-A-T-T]	13,0	11,2
d[G-A-T-T-T-T]	14,0	12,7
d[G-A-T-T-T-T-G-A]	14,6	13,4

<sup>a)</sup> Korrigiert (Verzögerung Gradient 4,5 Min.).

Tabelle 5. *R<sub>f</sub>*-Werte

	Dünnschichtchromatographie					Papierchromatographie	
	A	B	C	E	F	A	D
dG	0,48			0	0,46	0,3	
d[(ib)ibG(ib)]	0,75	0,76		0,3	0,67		
d[(MeOTr)ibG]	0,66	0,73	0,69	0,14	0,74		
dpA	0,2				0,21	0,10	0,68
dpbzA	0,33	0,42			0,27		
d[pbzA(Ac)]	0,31	0,64			0,43		
dpT	0,17	0,51	0,47		0,22	0,08	0,49
d[pT(Ac)]		0,56			0,43		
d[(CNEt)pT]	0,56	0,78	0,58		0,36		
dpG	0,05				0,13	0	0,38
d[pibG(ib)]	0,23	0,72			0,55		
dpibG	0,18	0,41			0,34		
d[(CNEt)pibG]	0,41	0,64			0,46		
d[(MeOTr)ibGpbzA]	0,67				0,5		
d[G-A]	0,39				0,16		
d[pTpT]	0,15	0,43	0,5		0,1		
d[pTpT(Ac)]	0,24	0,44	0,58		0,16		
d[pibGpbzA]	0,21	0,46			0,42		
d[pibGpbzA(Ac)]	0,21	0,58	0,58		0,42		
d[(MeOTr)ibGpbzApTpT]	0,51	0,77	0,58		0,44		
d[G-A-T-T]	0,28				0,04		
d[(MeOTr)ibGpbzApTpTpTpT]	0,34	0,69	0,43		0,42		
d[(MeOTr)ibGpbzApTpTpTpTpibGpbzA]	0,34		0,43		0,38		
dA	0,62				0,48	0,55	
dI	0,45				0,39	0,36	

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] N. Cerletti, U. Séquin, Ch. Tamm & W. Zürcher, *Helv.* 61, 2589 (1978).  
 [2] N. Cerletti, Dissertation, Basel 1975.  
 [3] 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, 209–492 (1972).  
 [4] 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. Chem.* 251, 565 (1976).  
 [4] H. Köster, H. Blöcker, R. Frank, St. Geussenhainer, W. Heidman & W. Kaiser, *Liebigs Ann. Chem.* 1978, 839.  
 [6] I. Gregor, U. Séquin & Ch. Tamm, *Helv.* 58, 712 (1975).  
 [7] N. Cerletti & Ch. Tamm, *Helv.* 60, 1182 (1977).  
 [8] F. Waldmeier & Ch. Tamm, *Helv.* 61, 1648 (1978).  
 [9] E. Volz & Ch. Tamm, *Helv.* 61, 2579 (1978).  
 [10] D.G. Knorre, A.V. Lebedev & V.F. Zarytova, *Nucl. Acids Res.* 3, 1401 (1976); D.G. Knorre & V.F. Zarytova, *ibid.* 3, 2709 (1976); D.G. Knorre, V.F. Zarytova, A.V. Lebedev, L.M. Khalimskaya & E.A. Sheshegova, *ibid.* 5, 1253 (1978).  
 [11] E. Jay, P.J. Cashion, M. Fridkin, B. Ramamoorthy, K.L. Agarwal, M.H. Caruthers & H.G. Khorana, *J. Biol. Chem.* 251, 609 (1976).  
 [12] R.A. Jones, H.-J. Fritz & H.G. Khorana, *Biochemistry* 17, 1268 (1978).

- [13] *J.B. Chattopadhyaya & C.B. Reese*, *Chem. Commun.* 1978, 639.
- [14] *K.L. Agarwal, Y.A. Berlin, H.-J. Fritz, M.J. Gait, D.G. Kleid, R.G. Lees, K.E. Norris, R. Belagaje & H.G. Khorana*, *J. Am. Chem. Soc.* 98, 1065 (1976).
- [15] *H. Takaku, R. Yamaguchi & T. Hata*, *Chem. Lett.* 1979, 5.
- [16] *K.L. Agarwal, M.H. Caruthers, M. Fridkin, A. Kumar, J.H. van de Sande & H.G. Khorana*, *J. Biol. Chem.* 251, 599 (1976).
- [17] *H. Weber & H.G. Khorana*, *J. Mol. Biol.* 72, 219 (1972).
- [18] *R. Weiss & E. Birch-Hirschfeld*, *J. Prakt. Chem.* 320, 1 (1978).
- [19] *H. Büchi & H.G. Khorana*, *J. Mol. Biol.* 72, 251 (1972).
- [20] *Y.A. Berlin, O.G. Chakhmakhcheva, V.A. Efimov, M.N. Kolosov & V.G. Korobko*, *Tetrahedron Lett.* 1973, 1353.
- [21] Vgl. *G. Graf*, Dissertation, Basel, in Vorbereitung.
- [22] *H. Schott & H. Kössel*, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 3778 (1973); *H. Schott, D. Fischer & H. Kössel*, *Biochemistry* 12, 3447 (1973).
- [23] *M. S. Poonian, W.W. McComas & A.L. Nussbaum*, *Gene* 1, 357 (1977).
- [24] *E. Ohtsuka & H.G. Khorana*, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 2195 (1967).
- [25] *R.V. Tomlinson & G.M. Tenner*, *J. Am. Chem. Soc.* 84, 2644 (1962).
- [26] *H.J. Fritz, R. Belagaje, E.L. Brown, R.H. Fritz, R.A. Jones, R.G. Lees & H.G. Khorana*, *Biochemistry* 17, 1257 (1978).
- [27] *U. Séquin & Ch. Tamm*, *Helv.* 55, 1196 (1972).
- [28] *U. Séquin*, *Helv.* 57, 68 (1974).
- [29] *K.K. Ogilvie & R.L. Letsinger*, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 30, 273 (1968).