

### 30. Nucleoside und Nucleotide. Teil 20. Synthese von Desoxy-ribooligonucleotiden nach der Diester- und Triestermethode mit 2(1*H*)-Pyrimidinon als Base<sup>1)2)</sup>

von Hans-Dieter Schneider und Christoph Tamm<sup>3)</sup>

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

(17.XI.82)

Nucleosides and Nucleotides. Part 20. Synthesis of Desoxyribooligonucleotides According to the Diester and Triester Method with 2(1*H*)-Pyrimidinone as Base

#### Summary

The syntheses of the dinucleosidemonophosphate 1-(2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidinon-(3'-5')-2'-deoxycytidine ( $M_{d}pC_{d}$ ; **4**) and the trinucleosidodiphosphate thymidyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5')-1-(2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidinon ( $T_{d}pT_{d}pM_{d}$ ; **1**) are described. Compound **1** was synthesized by different variants of the triester method, and **4** by the diester method as well as the triester method.

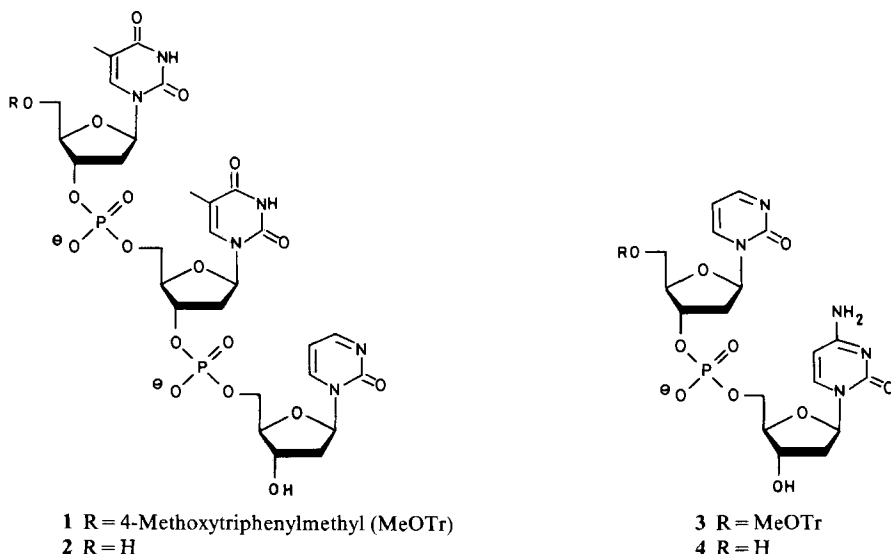
**1. Einleitung.** – Für die Aufklärung der Spezifität der DNA-Polymerase eignen sich besonders gut unnatürliche Nucleotide, deren Basen nur noch beschränkt zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken nach dem Prinzip von *Watson & Crick* [3] zu den natürlichen Nucleotiden fähig sind. Im Rahmen des Konzeptes [4] zur Untersuchung der DNA-Polymerase-Spezifität anhand einer DNA-Matrize, die ein unnatürliches Nucleotid enthält, benötigten wir das Trinucleosiddiphosphat 5'-*O*-Monomethoxytritylthymidyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5')-1-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidinon ((MeOTr) $T_{d}pT_{d}pM_{d}$ ; **1**)<sup>4)</sup>. Ferner war das Reaktionsverhalten von  $M_{d}^{4}$ ) hinsichtlich der Synthese von  $M_{d}pC_{d}$  (**4**) abzuklären. Da durch die Synthesen von  $M_{d}pT_{d}$  und  $M_{d}pG_{d}$  [6] und weitere Synthesen von Dimeren und Trimeren mit den unnatürlichen Nucleosiden  $\pi_{d}^{4}$ ) [7-9] und  $z_{d}^{4}$ ) [10] eine beträchtliche Erfahrung im Umgang mit der Diestermethode [11] gewonnen worden war, wurden die Synthesen von (MeOTr) $T_{d}pT_{d}pM_{d}$  (**1**) und von  $M_{d}pC_{d}$  (**4**) ebenfalls nach diesem Syntheseprinzip vorgenommen.

<sup>1)</sup> Teil 19: [1].

<sup>2)</sup> Für Einzelheiten vgl. [2].

<sup>3)</sup> Korrespondenzautor.

<sup>4)</sup> Zu den Abkürzungen vgl. [5]. Thymidyl = Thymidin-3'-*O*-yl, Thymidylyl = Thymidin-3',5'-di-*O*-yl,  $M_{d}$  = 1-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-Pyrimidinon,  $\pi_{d}$  = 1-(2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridinon und  $Z_{d}$  = 4-Amino-1-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridinon,  $\varphi$  = 4-Chlorphenylphosphat.



**2. Synthese von (MeOTr) $T_{d\varphi}T_{d\varphi}M_d$  (I).** – Für die Herstellung von (MeOTr)- $T_{d\varphi}T_{d\varphi}M_d$  (1) nach der Diestermethode wurde ein an der 3'-HO-Gruppe geschütztes 5'-Nucleotid  $pM_d$  benötigt.  $M_d$ , nach Kohler *et al.* [12] hergestellt, liess sich nach den Angaben von Kohler *et al.* [13], welche die Methode von Yoshikawa *et al.* [14] verwendet hatten, in einer Ausbeute von 61,5% phosphorylieren. Wir vereinfachten die Aufarbeitung, ersetzten Phosphorsäure-triäthylester durch Phosphorsäure-trimethylester und konnten so die Ausbeute auf 80% steigern<sup>5</sup>). Die Acylierung von  $\alpha M_d$  mit verschiedenen Acylierungsreagenzien [2] ergab kein einheitliches Produkt. Wegen der schlechten Löslichkeit des Ammonium- und Pyridiniumsalzes von  $\alpha M_d$  in Pyridin und anderen Lösungsmitteln mussten lange Reaktionszeiten in Kauf genommen werden, was wiederum die Spaltung der glykosidischen Bindung förderte.

Bei der Triestermethode nach Cashion *et al.* [15] braucht die 3'-HO-Gruppe des hinzukommenden Nucleosids nicht geschützt zu werden. Dies veranlasste uns, das Trinucleosiddiphosphat (MeOTr) $T_{d\varphi}T_{d\varphi}M_d$  (1) nach dieser Methode herzustellen.

(MeOTr) $T_{d\varphi}T_{d\varphi}M_d^4$ ). Zuerst wurde (MeOTr) $T_d$ , hergestellt nach einer Modifikation der Literaturangaben [16], nach [15] in (MeOTr) $T_{d\varphi}T_d$  übergeführt. Dieses wurde analog mit 3 Mol-Äquiv.  $M_d$  in (MeOTr) $T_{d\varphi}T_{d\varphi}M_d$  umgewandelt. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung erhielten wir dieses geschützte Trinucleosiddiphosphat in 26% Ausbeute. Das UV.-Spektrum wies die für  $T_d$  und  $M_d$  charakteristischen Absorptionsmaxima auf.

Ein analoger Versuch mit dem  $\alpha$ -Anomeren  $\alpha M_d$  ergab 34% geschütztes Trinucleosiddiphosphat (MeOTr) $T_{d\varphi}T_{d\varphi}\alpha M_d$ . Das UV.-Spektrum war identisch mit dem der entsprechenden  $\beta$ -Verbindung.

<sup>5</sup>) Wegen der begrenzten Menge an  $M_d$  ( $=\beta M_d$ ) wurde hier das  $\alpha$ -Anomere verwendet.

Da die Synthese von  $(\text{MeOTr})\text{T}_{d\phi}\text{T}_d\phi\text{M}_d$  nicht die erhoffte Ausbeute brachte ( $\text{M}_d$  muss im dreifachen Überschuss eingesetzt werden), versuchten wir die Herstellung des Trinucleosiddiphosphats mit einem Kondensationsmittel, nämlich 1-(4-Nitrobenzolsulfonyl)-1*H*-1,2,4-triazol (*p*-NBST) [17]. Die 3'-HO-Gruppe von  $\text{M}_d$  war zu diesem Zweck zu schützen, was eine Tritylierung, Acylierung und Enttritylierung erforderte. Als HO-Schutzgruppe wählten wir die Benzoylgruppe (Bz).

$(\text{MeOTr})\text{T}_{d\phi}\text{T}_d\phi\text{M}_d(\text{Bz})$ . Das nach einer abgeänderten Vorschrift [6] hergestellte  $(\text{MeOTr})\text{M}_d$  wurde mit Benzoesäureanhydrid und 4-Dimethylaminopyridin [18] in Pyridin umgesetzt.

Zur Abspaltung der (MeOTr)-Gruppe wurde als erhaltene  $(\text{MeOTr})\text{M}_d(\text{Bz})$  mit einem dreifachen molaren Überschuss an 2proz. Benzolsulfonsäure in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  [19] während 40 Min. behandelt<sup>6)</sup>. Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von Pyridin und chromatographischer Reinigung resultierten 89,5% des gewünschten Produkts. DC. und IR.-Spektrum zeigten, dass unter diesen Bedingungen vollständige Enttritylierung eintrat ohne den empfindlichen Nucleosidteil anzugreifen.

$(\text{MeOTr})\text{T}_{d\phi}\text{T}_d$  wurde mit *p*-Chlorphenylphosphordichloridat in Pyridin und anschliessend mit 3-Hydroxypropionitril (Cyanoäthanol) umgesetzt. Nach Extraktion des Reaktionsgemischs während 6 Std. bei 20° mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und 5proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung ergab das aus der organischen Phase stammende Rohprodukt nach chromatographischer Trennung an Kieselgel 57% reines  $(\text{MeOTr})\text{T}_{d\phi}\text{T}_d\phi$  (CNEt). Das UV.-Spektrum war identisch mit dem von  $(\text{MeOTr})\text{T}_{d\phi}\text{T}_d$ .

Die (CNEt)-Gruppe von  $(\text{MeOTr})\text{T}_{d\phi}\text{T}_d\phi$  (CNEt) wurde mit Pyridin/Triäthylamin nach [20] abgespalten und das gebildete  $(\text{MeOTr})\text{T}_{d\phi}\text{T}_d\phi^-$  mit  $\text{M}_d(\text{Bz})$  in Pyridin und 1-(4-Nitrobenzolsulfonyl)-1*H*-1,2,4-triazol umgesetzt. Nach Hydrolyse und chromatographischer Reinigung betrug die Ausbeute an  $(\text{MeOTr})\text{T}_{d\phi}\text{T}_d\phi\text{M}_d(\text{Bz})$  74,5%.

Da der Phosphorylierungsschritt mit 57% Ausbeute nicht befriedigte und die Herstellung von  $\text{M}_d(\text{Bz})$  in drei Reaktionsstufen zu aufwendig erschien, suchten wir nach einer wirksameren Phosphorylierungsmethode und einem Kondensationsmittel, mit dem ein Nucleosid mit ungeschützter 3'-HO-Gruppe angefügt werden kann. Dazu bot sich das von *Chattopadhyaya & Reese* [21] beschriebene Verfahren der Phosphorylierung und als Kondensationsmittel 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) [21] an. Die entsprechende Umsetzung von  $(\text{MeOTr})\text{T}_{d\phi}\text{T}_d$  in Pyridin mit *p*-Chlorphenylphosphordichloridat, 1,2,4-Triazol und Triäthylamin in Acetonitril und anschliessende Hydrolyse mit Triäthylamin/Wasser/Pyridin ergab das gewünschte  $(\text{MeOTr})\text{T}_{d\phi}\text{T}_d\phi^-$  in einer Ausbeute von 90%. Die Kondensation mit  $\text{M}_d$  wurde mit MSNT in Pyridin vorgenommen (Ausbeute 57%).

Ein analoger Versuch wurde mit  $\text{M}_d(\text{Bz})$  ausgeführt. Die Ausbeute betrug 60%.

Bei den Kondensationen mit und ohne 3'-HO-Schutzgruppe entstand jeweils eine unpolare Substanz, die ebenfalls trityl- und zuckerhaltig war.

*Abspaltung der Schutzgruppen.* Für die Abspaltung der Phosphatschutzgruppe verwendeten wir zunächst Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) [22]; TBAF wurde

<sup>6)</sup> Vgl. [19]: 20 Min.

analog [23] als 0,1 M Lösung in Tetrahydrofuran/Pyridin/Wasser eingesetzt.  $(\text{MeOTr})\text{T}_{\text{d}}\varphi\text{T}_{\text{d}}\varphi\text{M}_{\text{d}}$  hatte nach 3,25 Stunden vollständig reagiert. Das Reaktionsgemisch wurde an einer *DEAE-Sephadex A-25* Säule aufgetrennt.

Die Phosphatschutzgruppe liess sich auch mit (*E*)-*p*-Nitrobenzaldehydoxim und 1,1,3,3-Tetramethylguanidin in Dioxan/Wasser nach [21] entfernen. In der Verbindung  $(\text{MeOTr})\text{T}_{\text{d}}\varphi\text{T}_{\text{d}}\varphi\text{M}_{\text{d}}(\text{Bz})$  wurde dabei teilweise auch die Benzoylgruppe abgespalten<sup>7)</sup>. Die Abspaltung der Benzoylgruppe liess sich mit Natriummethanolat in Methanol oder mit Ammoniak gesättigtem Methanol vervollständigen ( $(\text{MeOTr})\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}\text{pM}_{\text{d}}$  (2)).

Die Abspaltung der Monomethoxytrityl (MeOTr)-Gruppe von 2 wurde mit Ameisensäure/MeOH 7:3 vorgenommen [6]. Das nach Chromatographie mit *DEAE-Sephadex A-25* resultierende  $\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}\text{pM}_{\text{d}}$  (1) zeigte im UV.-Spektrum ein Maximum bei 265 nm, eine Schulter bei 300 nm und ein Minimum bei 233 nm. Das Produkt wurde durch präparative Anionenaustausch-HPLC. gereinigt. Hydrolyse der Hauptkomponente mit Schlangengift-Phosphodiesterase lieferte ausschliesslich die erwarteten Produkte.

Die Monomethoxytritylgruppe liess sich unter geeigneten Bedingungen mit dem schon oben erwähnten Reagenz – 2proz. Benzolsulfonsäure in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  [19] – ebenfalls abspalten. In Hinsicht auf das Gesamtkonzept [4] wurde jedoch der ersten Methode – Ameisensäure in MeOH – der Vorzug gegeben.

Bei den Abspaltungsreaktionen der Phosphatschutzgruppe und der Monomethoxytritylgruppe wurde jeweils als Nebenprodukt eine Substanz erhalten, die einen erhöhten  $\epsilon$ -Verhältnis-Wert<sup>8)</sup> aufwies. Diese Erscheinung kann mit einer teilweisen Abspaltung der Pyrimidon-Base erklärt werden.

**3. Synthese von 1-(2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2 (1*H*)-pyrimidinon-(3'-5')-2'-desoxycytidin ( $\text{M}_{\text{dp}}\text{C}_{\text{d}}$ , 4).** – Die Synthese von  $\text{M}_{\text{dp}}\text{C}_{\text{d}}$  (4) wurde zunächst nach der Diestermethode vorgenommen (Übersicht s. [11]). Das dazu benötigte 3'-O-Acetyl-*N*<sup>4</sup>-anisoyl-2'-desoxycytidin-5'-phosphat ( $\text{p}^{\text{an}}\text{C}_{\text{d}}(\text{Ac})$ ) wurde aus 2'-Desoxycytidin-5'-phosphat ( $\text{pC}_{\text{d}}$ ) nach [25] [26] hergestellt. Zur Herstellung von  $(\text{MeOTr})\text{M}_{\text{dp}}^{\text{an}}\text{C}_{\text{d}}$  wurde ein Mol.-Äquiv.  $(\text{MeOTr})\text{M}_{\text{d}}$  mit 2 Mol.-Äquiv. Pyridiniumsalz von  $\text{p}^{\text{an}}\text{C}_{\text{d}}(\text{Ac})$  mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Pyridin umgesetzt und nach 6 Tagen hydrolysiert. Nach Entfernung des Dicyclohexylharnstoffs, Hydrolyse des Rückstandes mit 1 N NaOH in Pyridin/Wasser unter Zugabe von wenig Äthanol und Neutralisation mit Pyridinium-*Dowex*-Ionenaustauscher wurde die wässrige Phase eingeengt und lyophilisiert. Das Lyophilisat trennte man mittels präparativer Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel. Die Charakterisierung des Produkts<sup>9)</sup> erfolgte durch DC. und UV.-Spektroskopie.

Für die Abspaltung der Anisoylgruppe in  $(\text{MeOTr})\text{M}_{\text{dp}}^{\text{an}}\text{C}_{\text{d}}$  erwies sich  $\text{NH}_3$ -gesättigtes  $\text{CH}_3\text{OH}$  als am vorteilhaftesten. Zur Reinigung diente die Dünnschichtchromatographie.

<sup>7)</sup> Vgl. [24], Fussnote 15.

<sup>8)</sup>  $\epsilon$ -Verhältnis-Wert = Verhältnis der  $\epsilon$ -Werte der  $\text{T}_{\text{d}}$ - und  $\text{M}_{\text{d}}$ -Chromophore bei den Maxima im UV.-Spektrum.

<sup>9)</sup> Das Produkt war mit wenig  $(\text{MeOTr})\text{M}_{\text{dp}}^{\text{an}}\text{C}_{\text{d}}(\text{Ac})$  verunreinigt.

$M_{d\phi}C_d$  (4) wurde durch Abspaltung der Monomethoxytritylgruppe in  $(MeOTr)M_{d\phi}C_d$  (3) mit Ameisensäure/ $CH_3OH$  7 : 3 gewonnen und an *DEAE-Sephadex A-25* gereinigt (Ausbeute 69%). Nach der letzten Reinigung durch Anionenaustausch-HPLC. wurde das Dinucleotid mit Schlangengift-Phosphodiesterase behandelt. Im Gemisch der Produkte waren lediglich  $M_d$  und  $pC_d$  nachweisbar.

Obwohl die mit der Diestermethode erhaltenen Resultate befriedigend waren, schien es uns interessant, das Verhalten von  $(MeOTr)M_d$  unter den Bedingungen der Triestermethode vergleichend zu untersuchen. Die Triestermethode hat sich in den letzten Jahren stark entwickelt und gilt heute als das einfachere und leistungsfähigere Verfahren.

Zunächst wurde  $(MeOTr)M_{d\phi}^{an}C_d$  nach der Methode von *Cashion et al.* [15] hergestellt. Das dazu benötigte  $^{an}C_d$  wurde aus  $C_d$  und Anisoylchlorid in Pyridin [27] [28] in einer Ausbeute von 84% erhalten. Dann wurde eine Lösung von *p*-Chlorphenylphosphordichloridat in Pyridin mit *N*-Methylimidazol, Triäthylamin und 1,2,4-Triazol versetzt und zuerst mit  $(MeOTr)M_d$ , schliesslich mit 3 Mol.-Äquiv.  $^{an}C_d$  umgesetzt. Nach Säulenchromatographie wurde  $(MeOTr)M_{d\phi}^{an}C_d$  in 50% Ausbeute erhalten.

Da bei dieser Synthese  $^{an}C_d$  in dreifachem Überschuss eingesetzt werden muss und kaum zurückgewonnen werden kann, wurde als andere Variante der Triestermethode diejenige von *Chattopadhyaya & Reese* [21] versucht, die sich bei der Synthese von  $(MeOTr)T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$  bewährt hatte. Die Phosphorylierung von  $(MeOTr)M_d$  erfolgte wie bei  $(MeOTr)T_{d\phi}T_d$  und ergab  $(MeOTr)M_{d\phi}^-$  in einer Ausbeute von 94%. Als Kondensationsmittel wurde MSNT in dreifachem molarem Überschuss ([21]: sechsfach) eingesetzt, was die Bildung von Nebenprodukten verringern soll. Ausserdem wurde  $^{an}C_d$  in einem 1,1-fachen Überschuss bezogen auf die Phosphatkomponente eingesetzt. Die Kondensationsreaktion war in 35 Min. abgeschlossen. Nach der üblichen Aufarbeitung und Säulenchromatographie wurden nur 19% reines  $(MeOTr)M_{d\phi}^{an}C_d$  erhalten, daneben weiteres Material, das mit  $^{an}C_d$  verunreinigt war.

Die beiden nach verschiedenen Triestermethoden synthetisierten Verbindungen waren im UV.-Spektrum identisch. Abspaltung der Phosphatschutzgruppen mit (*E*)-*p*-Nitrobenzaldehydoxim [21] führte zu  $(MeOTr)M_{d\phi}^{an}C_d$ , das nach UV.-Spektrum identisch war mit dem nach der Diestermethode hergestellten Produkt. Auf dieser Stufe konnte das obenerwähnte unreine Material von  $^{an}C_d$  befreit werden mittels Dickschichtchromatographie.

Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Siehe auch [29]. DC.-Systeme: A: 2-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser 7:1:2 (v/v); B: Äthanol/1M Ammoniumacetat (pH 7,5) 7:3; C: 1-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser 55:10:35; D:  $CH_2Cl_2/MeOH$  92:8; E:  $CH_2Cl_2/MeOH$  85:15; K: 1-Butanol/Essigsäure/Wasser 5:2:3. Für die Scheiben (Durchmesser: 24 cm) des *Chromatotrions* (600 U/Min.) wurde Kieselgel 60 *GF<sub>254</sub>* «für die Dünnschichtchromatographie», und für die «short-column»-Chromatographie, die bei allen Triester-versuchen Verwendung fand, Kieselgel 60 (Korngrösse 40–63  $\mu m$ ) benutzt. Die Kieselgele stammen von

*Merck*. Für die HPLC. diene eine *Partisil-10 SAX*-Säule (4,6 × 250 mm) von *Whatman*. HPLC.-Systeme [30]: A: 10<sup>-1</sup>M TEAA; pH 3,1; 1 ml/Min.; 254-nm-Nachweis. B: 10<sup>-2</sup>M TEAA; pH 3,1; 1 ml/Min.; 254-nm-Nachweis. C: 5 · 10<sup>-2</sup>M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 3,3; 1 ml/Min.; 280-nm-Nachweis. D: 2 · 10<sup>-2</sup>M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 3,3; 0,5 ml/Min.; 280-nm-Nachweis.

Pyridin, Acetonitril, Dioxan und Triäthylamin wurden 14 Std. über Calciumhydrid unter Rückfluss gehalten, destilliert und über Molekularsieb (3 Å bzw. 4 Å) aufbewahrt. Alle Kondensationen wurden unter Ar ausgeführt. Beim Trocknen der Substanzen durch mehrmaliges Abdampfen von Pyridin i.HV. wurde der Rotationsverdampfer jeweils mit Ar gefüllt. Die Ausbeuten der Reaktionen, die Mononucleotide betreffen, wurden UV.-spektroskopisch bestimmt, die anderen gravimetrisch. Sämtliche Produkte wurden bei -20° gelagert. Für die enzymatischen Spaltungen wurden folgende Enzyme eingesetzt: Schlangengift-Phosphodiesterase mit 5'-Nucleotidasen-Aktivität (E.C.3.1.4.1., Venom Phosphodiesterase I, *Crotalus atrox*, *P-L Biochemical Inc.*); alkalische Phosphatase (E.C.3.1.3.1. *Escherichia coli*, *Worthington Biochemical Corporation*); Phosphodiesterase I aus Schlangengift (*Merck*). Die Herstellung von M<sub>d</sub> erfolgte nach [12]. Die α- und β-Anomeren wurden mittels DC. durch Referenzvergleich [6] und durch <sup>1</sup>H-NMR.-Spektren zugeordnet.

2. *Herstellung von 1-(2'-Desoxy-α-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon-5'-O-phosphat (pαM<sub>d</sub>)*. Bei 0° wurden 1,3 ml Phosphorsäure-trimethylester, 92 µl (1,0 mmol) Phosphorylchlorid und 6 µl (0,33 mmol) Wasser zusammengegeben und 10 Min. gerührt. Diese Lösung wurde zu 86 mg (0,4 mmol) αM<sub>d</sub> gegeben. Nach 140 Min. bei 0° und 15 Std. bei -20° wurde mit 7,5 ml 0,5M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung bei 0° neutralisiert. Nach 5 Std. bei 0° wurde die Lösung auf eine *DEAE-Sephadex A-25* Säule (100 × 1 cm, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Form) gegeben. Die Elution erfolgte mit einem NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Gradienten in 2 Stufen (1. Elutionsgradient: 3 l Wasser im Mischgefäß, 3 l 0,1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in Wasser im Vorratsgefäß; 2. Elutionsgradient: 1 l 0,077M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in Wasser im Mischgefäß, 1 l 0,3M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in Wasser im Vorratsgefäß; Fraktionen zu 24 ml).

Fraktionen	Konz. von NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> [mol/l]	Substanz	OD <sub>301</sub> <sup>10)</sup>	Ausbeute [%]
1-5	0,0004-0,002	αM <sub>d</sub>	56	2,5
132-171	0,053-0,068	pαM <sub>d</sub>	1757	80,5
261-267	0,25 -0,27	3',5'-Diphosphat	240	11

Die Fr. 132-171 wurden vereinigt, abgedampft und lyophilisiert. Im DC. (A, C) war die Substanz (Ammoniumsalz) einheitlich. - UV. (Wasser): Max. 301, 212.

Der Abbau des Nucleotides mit alkalischer Phosphatase ergab nach einer Inkubationszeit von 50 Min. das α-Anomere (αM<sub>d</sub>). Mit Phosphodiesterase I (*Crotalus atrox*) mit 5'-Nucleotidasenaktivität hingegen fand in der gleichen Zeit fast keine Abspaltung der Phosphatgruppe statt im Gegensatz zum β-Anomeren pM<sub>d</sub>, wo die Spaltung zum Nucleosid M<sub>d</sub> unter gleichen Bedingungen vollständig war.

3. *Herstellung von (MeOTr)T<sub>d</sub>φT<sub>d</sub>φM<sub>d</sub>*. - 3.1. *(MeOTr)T<sub>d</sub>φT<sub>d</sub>*. Ein Gemisch von 0,508 ml (6,4 mmol) *N*-Methylimidazol, 0,222 ml (1,6 mmol) Triäthylamin und 112 mg (1,6 mmol) 1,2,4-Triazol wurde 15 Min. gerührt. Diese Lösung wurde zu 0,086 ml (0,52 mmol) *p*-Chlorphenylphosphordichloridat in 1,4 ml Pyridin gegeben. Nach 20 Min. wurden zu der entstandenen Suspension 206 mg (0,4 mmol) (MeOTr)T<sub>d</sub> in 0,6 ml Pyridin gegeben. (MeOTr)T<sub>d</sub> war durch mehrmaliges Abdampfen mit Pyridin getrocknet worden. Nach weiteren 20 Min. wurden 290 mg (1,2 mmol) Thymidin (T<sub>d</sub>) und 1,4 ml Pyridin zugegeben. Das Kondensationsgemisch wurde nach 3 Std. mit 1,8 ml Wasser hydrolysiert. Es wurde sofort i.V. unter mehrmaliger Pyridinzugabe eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 50 ml 2,5proz. NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung und 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/2-Propanol (9:1) extrahiert. Die org. Phase wurde nochmals mit 50 ml 2,5proz. NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert, die wässr. Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/2-Propanol (9:1) (4 × 50 ml). Nach Trocknen der vereinigten org. Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde i.V. eingedampft und das restliche Pyridin durch Abdampfen mit Toluol entfernt. Der Rückstand wurde auf einer Kieselgel-Säule (60 g) durch Elution mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und steigendem Gehalt an MeOH getrennt. Bei einem MeOH-

<sup>10)</sup> 1 OD-Einheit ist die Menge Substanz, die in 1 ml Lösung in einer 1-cm-Zelle eine Absorption von 1,0 ergibt.

Anteil von 3,5–4% wurde ein trityl- und zuckerhaltiges Nebenprodukt (Ausbeute 12%) und bei 5–5,5% MeOH-Gehalt (MeOTr) $T_{d\phi}T_d$  (Ausbeute von 80%) isoliert. Letzteres war im DC. (D, E) einheitlich und färbte sich nach Besprühen mit 10proz. HClO<sub>4</sub>-Lösung und Erhitzen zuerst gelb danach schwarz. – UV. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5): Max. 263; Min. 244; 236 S.  $\epsilon^{263}/\epsilon^{244} = 1,36$ . Das UV.-Spektrum des Nebenproduktes war identisch mit dem von (MeOTr) $T_{d\phi}T_d$ .

3.2. (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$ . Die Herstellung erfolgte analog derjenigen von (MeOTr) $T_{d\phi}T_d$ . (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$  wurde von der Kieselgel-Säule bei einem MeOH-Gehalt von 9–10% eluiert; Ausbeute 26%, im DC. (D, E) einheitlich. – UV. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 92:8): Max. 307, 264; Min. 244; 236 S.  $\epsilon^{264}/\epsilon^{307} = 4,29$ .

4. Herstellung von (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d(Bz)$  mit 1-(4-Nitrobenzolsulfonyl)-1H-1,2,4-triazol (*p*-NBST) als Kondensationsmittel. – 4.1. (MeOTr) $M_d(Bz)$ . Ein Gemisch von 140 mg (0,28 mmol) (MeOTr) $M_d$  und 12 mg (0,1 mmol) 4-(Dimethylamino)pyridin wurde 3mal mit 1,5 ml Pyridin versetzt und i.HV. abgedampft. Das zurückbleibende Öl wurde in 3 ml Pyridin gelöst und dazu wurden 100 mg (0,44 mmol) Benzoesäureanhydrid gegeben. Nach 3 Std. wurde fast alles Pyridin abgedampft, der Rückstand in 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und 2mal mit 25 ml 5proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 20 ml Wasser extrahiert. Die wässr. Phasen wurden 3mal mit 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeschüttelt. Die vereinigten org. Phasen wurden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i.V. eingedampft. Der Rückstand, in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst, wurde an Kieselgel mittels Chromatotron mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und steigenden Mengen MeOH getrennt. Bei einem MeOH-Gehalt von 2% wurde (MeOTr) $M_d(Bz)$  erhalten, Ausbeute 88%; im DC. (D, E) einheitlich, nach Besprühen mit 10proz. HClO<sub>4</sub>-Lösung und Erhitzen Gelb- und danach Schwarzfärbung. – UV. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2): Max. 310, 281; Min. 288, 260.  $\epsilon^{310}/\epsilon^{281} = 1,24$ .

4.2.  $M_d(Bz)$ . Bei 0° wurden 90 mg (0,15 mmol) (MeOTr) $M_d(Bz)$  mit 3,5 ml einer 2proz. Benzolsulfonsäure-Lösung in CHCl<sub>3</sub>/MeOH (7:3) versetzt. Nach 40 Min. wurde die Reaktion durch Zugabe von wenig Pyridin abgebrochen. Es wurde mit 20 ml CHCl<sub>3</sub> und 20 ml 5proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Die org. Phase wurde nochmals mit 20 ml 5proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und mit 20 ml Wasser geschüttelt. Die wässr. Phasen wurden mit CHCl<sub>3</sub> (4 × 20 ml) extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten org. Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abdampfen wurde der Rückstand mittels Chromatotron an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und steigenden Mengen MeOH getrennt. Bei einem MeOH-Gehalt von 8% wurde  $M_d(Bz)$  erhalten, Ausbeute 89,5%, Smp. 177–180°, im DC. (D, E) einheitlich, nach Besprühen mit 10proz. HClO<sub>4</sub>-Lösung und Erhitzen Schwarzfärbung. – IR. (KBr): u.a. 3420 (OH); 1720 (C=O, Ester); 1660 (C=O, Pyrimidinon-Ring).

4.3. (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}(CNEt)$ . Dreimal wurden 280 mg (0,30 mmol) (MeOTr) $T_{d\phi}T_d$  mit 1,5–2 ml Pyridin versetzt und i.HV. abgedampft. Der ölige Rückstand wurde in 3 ml Pyridin gelöst und 64 µl (0,39 mmol) *p*-Chlorphenylphosphordichloridat wurden dazu gegeben. Zu dieser Lösung wurden nach 30 Min. 0,268 ml (3,9 mmol) Cyanoäthanol gegeben. Nach 6 Std. wurde i.HV. eingengt, der Rückstand, in wenig Pyridin gelöst, wurde in 30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen und mit 5proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2 × 30 ml) extrahiert. Die wässr. Phasen wurden mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 30 ml) zurückextrahiert. Die vereinigten Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i.V. abgedampft. Der Rückstand wurde mittels Chromatotron an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und steigenden Mengen MeOH getrennt. Bei 4–6% MeOH-Gehalt resultierten 57% (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}(CNEt)$  als farbloser Schaum, im DC. (D, E) einheitlich. – UV. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 94:6): Max. 263; Min. 244; 236 S.  $\epsilon^{263}/\epsilon^{244} = 1,32$ .

4.4. (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d(Bz)$ . Durch mehrmaliges Abdampfen mit Pyridin i.V. wurden 198 mg (0,168 mmol) (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}(CNEt)$  getrocknet. Der Rückstand wurde in 3,5 ml Pyridin aufgenommen und dazu wurden 1,17 ml (8,44 mmol) Triäthylamin gegeben. Die Lösung wurde 14 Std. bei 20° stehengelassen, danach i.HV. eingengt und 2mal mit 1 ml Pyridin versetzt und abgedampft. Es resultierte ein gelber Schaum, zu dem 45 mg (0,142 mmol)  $M_d(Bz)$ , in wenig Pyridin gelöst, gegeben wurden. Das Gemisch wurde 3mal mit Pyridin versetzt und i.HV. abgedampft. Der Rückstand wurde in 3 ml Pyridin gelöst und dazu wurden 110 mg (0,43 mmol) 1-(4-Nitrobenzolsulfonyl)-1H-1,2,4-triazol (*p*-NBST) gegeben. Nach 48 Std. wurde die Reaktionslösung bei 0° mit 1 ml Wasser von 0° 35 Min. hydrolysiert. Nach Abdampfen wurde der Rückstand in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und mit 5proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2 × 50 ml) und 25 ml Wasser extrahiert. Die wässr. Phasen wurden mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 40 ml) geschüttelt. Nach Trocknen der vereinigten org. Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Eindampfen i.V. wurde der Rückstand auf Kieselgel mittels Chromatotron mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und steigenden Mengen MeOH getrennt. (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d(Bz)$  wurde bei einem MeOH-Gehalt von 6% eluiert; Ausbeute 74,5%, im DC. (D, E) einheitlich. – UV. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 94:6): Max. 308, 263; Min. 248; 236 S.  $\epsilon^{263}/\epsilon^{308} = 3,79$ .

5. Herstellung von (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$  mit 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) als Kondensationsmittel. – 5.1. (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}$ . Zu einer Lösung von 0,102 ml (0,62 mmol) *p*-Chlorphenyl-

phosphordichloridat in 0,62 ml Acetonitril wurden 112 mg (1,62 mmol) 1,2,4-Triazol, 0,62 ml Acetonitril und 0,173 ml (1,24 mmol) Triäthylamin gegeben. Die Suspension wurde 20 Min. gerührt und danach mit 192 mg (0,20 mmol) (MeOTr) $T_{d\phi}T_d$  in 1,2 ml Pyridin versetzt. Nach 40 Min. wurde mit einem Gemisch aus 0,05 ml Wasser, 0,173 ml Triäthylamin und 0,5 ml Pyridin hydrolysiert. Nach 20 Min. wurde die Lösung zu 20 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben und mit CHCl<sub>3</sub> (6 × 20 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (4 × 25 ml) ausgeschüttelt, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i.V. eingedampft. Fälln des Rückstandes in wenig CHCl<sub>3</sub> mit 120 ml Petroläther (30–40°) ergab (MeOTr) $T_{d\phi}T_d$  als schwach gelbliches Pulver, Ausbeute 90%.

5.2. (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$ . Dreimal wurden 100 mg (0,08 mmol) (MeOTr) $T_{d\phi}T_d$  und 16 mg (0,075 mmol) M<sub>d</sub> mit ca. 0,8 ml Pyridin versetzt und i.HV. abgedampft. Der Rückstand wurde in 1,2 ml Pyridin gelöst und 61 mg (0,20 mmol) 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) wurden dazugegeben. Nach 35 Min. wurde tropfenweise mit 0,15 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung hydrolysiert. Nach 15 Min. wurde die Lösung zu 15 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben und mit CHCl<sub>3</sub> (10 × 15 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde an einer Kieselgel-Säule mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und steigenden Mengen MeOH getrennt. Bei einem MeOH-Gehalt von 5–6% wurden trityl- und zuckerhaltige Nebenprodukte und bei 8–10% MeOH-Gehalt (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$  isoliert. Die Ausbeute an DC. (D, E)-reinem Produkt betrug 57%. – UV. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 92:8): Max. 310, 265; Min. 246; 236 S.  $\epsilon^{265}/\epsilon^{310} = 3,9$ .

5.3. (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$ (Bz) wurde analog 5.1 und 5.2 hergestellt und bei einem MeOH-Gehalt von 5% eluiert; Ausbeute 60%. – UV. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 92:8): Max. 310, 265; Min. 249; 240 S.  $\epsilon^{265}/\epsilon^{310} = 3,9$ .

6. *Abspaltung der Schutzgruppen.* – 6.1. (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$  (1). Zu einer Lösung von 28 mg (0,021 mmol) (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$  in 0,43 ml Dioxan wurden 71 mg (0,427 mmol) (E)-p-Nitrobenzaldehydoxim, 53  $\mu$ l (0,427 mmol) 1,1,3,3-Tetramethylguanidin und 0,43 ml Wasser gegeben. Nach 20 Std. wurde die braunrote Lösung mit Pyridinium-Dowex Ionenaustauscher neutralisiert, letzterer über eine Säule abfiltriert und mit 50 ml 50proz. Pyridin in Wasser und 70 ml 50proz. Äthanol in Wasser gewaschen. Nach Einengen des Filtrats unter mehrmaliger Pyridinzugabe wurde der Rückstand mit je 15 ml Wasser und Äther extrahiert. Die wässr. Phase wurde noch mit Äther (2 × 15 ml) ausgeschüttelt (die ätherischen Phasen mit Wasser (4 × 15 ml)). Die vereinigten wässr. Phasen wurden unter mehrmaliger Pyridinzugabe eingedampft und lyophilisiert. Das Produkt war gemäss DC. (A, B, C, K) noch schwach verunreinigt mit einer unpolaren, nur UV.-aktiven Substanz. Das Lyophilisat wurde an einer DEAE-Sephadex A-25 Säule (100 × 1 cm, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Form) mit einem linearen NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Gradienten in wässr. Alkohol gereinigt (Elutionsgradient: 2,5 l 30% Äthanol im Mischgefäss, 2,5 l 0,25M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in 30proz. Äthanol; Fraktionen zu 18,5 ml).

Fraktionen	Konz. von NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Substanz	OD <sub>300</sub>
I 91–110	0,08–0,10	(MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$ (1)	48,1
II 111–120	0,10–0,11	(MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$ (1) + (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}Rib_d^a$ )	14,1

<sup>a</sup>) Rib<sub>d</sub> = 2-Desoxyribose

Nach Abdampfen der Fr. I und II unter Pyridinzusatz wurde der jeweilige Rückstand lyophilisiert. Die Ausbeute von 1 aus Fr. I betrug 67%. – UV. (Wasser, von I und II): Max. 268; Min. 245; 300 S; Fr. I:  $\epsilon^{268}/\epsilon^{300} = 3,50$ ,  $\epsilon^{268}/\epsilon^{245} = 1,63$ ; Fr. II:  $\epsilon^{268}/\epsilon^{300} = 4,93$ ,  $\epsilon^{268}/\epsilon^{245} = 1,88$ .

6.2. (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$ . Die Lösung von 26 mg (0,020 mmol) (MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$  in 1,6 ml (0,16 mmol) 0,1N Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF)-Reagenz (0,1N TBAF in Tetrahydrofuran/Pyridin/Wasser 8:1:1) wurde nach 3,25 Std. unter mehrmaliger Pyridinzugabe eingedampft und der Rückstand an einer DEAE-Sephadex A-25 Säule (100 × 1 cm, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Form) getrennt. Die Elution erfolgte in 2 Stufen mit einem NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Gradienten (1. Elutionsgradient: 1,5 l Wasser im Mischgefäss, 1,5 l 0,15M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in Wasser im Vorratsgefäss; 2. Elutionsgradient: 2,5 l 30proz. Äthanol im Mischgefäss, 2,5 l 0,25M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in 30proz. Äthanol im Vorratsgefäss; Fraktionen zu ca. 20 ml).

Fraktionen	Konz. von NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> [mol/l]	Substanz	OD <sub>300</sub>
201–234 (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	0,09–0,12	(MeOTr) $T_{d\phi}T_{d\phi}M_d$	76



Die Fraktionen wurden eingedampft und lyophilisiert. Die Substanz war im DC. (A, B, C) einheitlich. – UV. (Wasser/Äthanol 1:1): 300 S; Max. 266; Min. 244.  $\epsilon^{266}/\epsilon^{300} = 3,34$ ,  $\epsilon^{266}/\epsilon^{244} = 1,55$ .

6.3.  $T_{dP}T_{dP}M_d$ . Bei 0° wurden 12 mg (0,01 mmol, Ammoniumsalz)  $(MeOTr)T_{dP}T_{dP}M_d$  mit 1 ml Ameisensäure/MeOH 7:3 von 0° versetzt; die gelbe Lösung wurde nach 4 Min. bei 0° i. HV. abgedampft. Der Rückstand wurde nacheinander mit Äthanol, 50proz. wässr. Äthanol (2mal) und Wasser (2mal) versetzt und jeweils i. HV. abgedampft. Danach wurde mit 15 ml Wasser und 8 ml Äther/Petroläther 4:1 extrahiert. Die Wasserphase wurde noch mit 8 ml Äther/Petroläther ausgeschüttelt; die organischen Phasen wurden mit Wasser (2×10 ml) ausgeschüttelt. Die vereinigten wässr. Phasen wurden unter mehrmaliger Pyridinzugabe eingeengt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde an einer DEAE-Sephadex A-25 Säule (40×1 cm,  $HCO_3^-$ -Form) mit einem linearen wässr.  $NH_4HCO_3$ -Gradienten gereinigt (Elutionsgradient: 2 l Wasser im Mischgefäß, 2 l 0,2M  $NH_4HCO_3$  in Wasser im Vorratsgefäß; Fraktionen zu 25 ml).

Fraktionen	Konz. von $NH_4HCO_3$ [mol/l]	Substanz	$OD_{301}$
I 45–52	0,057–0,066	$T_{dP}T_{dP}M_d$ (2)	38
II 53–56	0,067–0,071	$T_{dP}T_{dP}M_d$ (2) + $T_{dP}T_{dP}Rib_d^a$	2

<sup>a)</sup>  $Rib_d = 2$ -Desoxyribose

Die Fr. I und II wurden unter mehrmaliger Pyridinzugabe abgedampft und lyophilisiert. Die Ausbeute von 2 aus I betrug 70%. – UV. (Wasser, von I und II): 300 S; Max. 265; Min. 233; Fr. I:  $\epsilon^{265}/\epsilon^{300} = 3,4$ ; Fr. II:  $\epsilon^{265}/\epsilon^{300} = 4,4$ .

Nach der HPLC.-Analyse waren in Fr. I noch Verunreinigungen enthalten, die durch Sephadex nicht abtrennbar waren (Fig. 1). Die beiden Hauptspitzen wurden lyophilisiert. A:  $\epsilon^{265}/\epsilon^{300} = 3,24$ ; B:  $\epsilon^{265}/\epsilon^{300} = 3,45$ . Fraktion A wurde später für den enzymatischen Abbau verwendet.

7. Herstellung von  $M_{dP}C_d$  (4). – 7.1.  $(MeOTr)M_{dP}^{an}C_d$ . Im HV. wurden 48,4 mg (0,1 mmol)  $(MeOTr)M_d$  und 112 mg (0,2 mmol, Pyridiniumsalz)  $p^{an}C_d(Ac)$  3mal mit 2,5 ml Pyridin getrocknet. Zum Rückstand wurden 5 ml Pyridin und 413 mg (2 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) gegeben. Nach 6 Tagen wurden zu der bräunlichen Suspension 2 ml Pyridin und bei 0° tropfenweise 9 ml Wasser gegeben. Nach 17 Std. Rühren bei 20° wurde der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff über Watte abfiltriert und der Rückstand mit 70 ml Pyridin/Wasser 1:1 gewaschen. Das Filtrat wurde i. V. eingeengt, mit 100 ml 20proz. Pyridin in Wasser versetzt und mit 100 ml Äther/Pentan 4:1 extrahiert. Die wässr. Phase wurde i. V. unter mehrmaliger Pyridinzugabe eingeengt. Zuletzt war die Substanz in wenig Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurden 20 ml 50proz. Pyridin in Wasser gegeben. Das Gemisch wurde auf 0° gekühlt und dazu wurden 20 ml auf 0° vorgekühlte 2N wässr. NaOH und 3 ml Äthanol gegeben. Nach 20 Min. bei 0° wurde die Lösung mit 60 ml kaltem Pyridinium-Dowex Ionenaustauscher neutralisiert. Nach Abfiltrieren des Ionenaustauschers über eine Säule, wurde noch mit 250 ml 50proz.

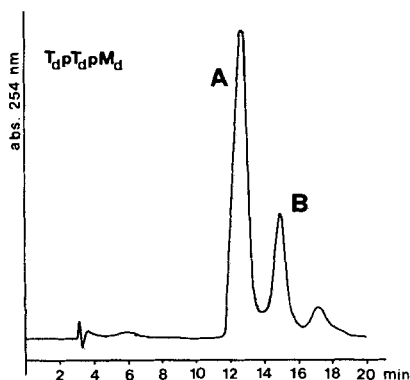


Fig. 1. HPLC. von  $T_{dP}T_{dP}M_d$  (2) (System A)

wässr. Pyridin eluiert. Nach Einengen i.V. wurde lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in MeOH/Pyridin 4:1 gelöst und mittels präp. DC. (20×20 cm, Kieselgel, MeOH/CHCl<sub>3</sub> 1:1) getrennt. (Banden waren wegen der Anwesenheit von Pyridin nur schlecht sichtbar.) Die das Produkt enthaltende Zone wurde mit 150 ml Äthanol/Pyridin 4:1 eluiert. Das Filtrat wurde unter Pyridinzugabe eingengt und unter Zusatz von Wasser lyophilisiert. Im DC. (A, B, C, K) war unmittelbar oberhalb des Produktes noch wenig acetyliertes Produkt (MeOTr)M<sub>d</sub>p<sup>an</sup>C<sub>d</sub>(Ac) zu sehen, wie aus dem folgenden Abspaltungsversuch zu entnehmen war. Die Ausbeute betrug ca. 80% (inkl. acetyliertem Produkt). – UV. (MeOH): 302 S; Max. 277; Min. 245;  $\epsilon^{277}/\epsilon^{302} = 1,24$ ,  $\epsilon^{277}/\epsilon^{245} = 1,81$ .

7.2. (MeOTr)M<sub>d</sub>p<sup>an</sup>C<sub>d</sub> (3). Es wurden 20 mg (MeOTr)M<sub>d</sub>p<sup>an</sup>C<sub>d</sub>(Pyridiniumsalz), das mit wenig (MeOTr)M<sub>d</sub>p<sup>an</sup>C<sub>d</sub>(Ac) verunreinigt war (s. 7.1), in 3 ml mit NH<sub>3</sub> ges. MeOH gelöst. Nach 16 Std. war im DC. (A, C, K) nur noch ein trityl- und zuckerhaltiger Fleck neben einem unpolaren, nur UV.-aktiven Fleck zu sehen. Die Lösung wurde i.V. eingedampft, mit MeOH versetzt und abgedampft. Der Rückstand wurde mittels präp. DC. (10×20 cm, Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1) getrennt. Die das Produkt enthaltende Zone wurde mit 100 ml Äthanol/Pyridin 4:1 extrahiert, das Filtrat unter Pyridinzugabe eingedampft, der Rest mit Wasser versetzt und lyophilisiert; Ausbeute 87%, im DC. (A, B, C, K) einheitlich. – UV. (MeOH/Wasser 1:1): Max. 274; Min. 255; 235 S, 302.  $\epsilon^{274}/\epsilon^{302} = 2,0$ ,  $\epsilon^{274}/\epsilon^{255} = 1,28$ .

7.3. M<sub>d</sub>pC<sub>d</sub> (4). Die Abspaltung der Monomethoxytritylgruppe in 3 erfolgte analog 6.3 (Elutionsgradient: 2 l Wasser im Mischgefäß, 2 l 0,03 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in Wasser im Vorratsgefäß; Fraktionen: 24,9 ml). In den Fr. 40–50 bei einem Gradienten von 0,007–0,009 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> wurde 4 eluiert. Die Fr. 40–50 wurden i.V. eingedampft; durch Zugabe von Wasser/MeOH wurde NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> entfernt und der Rest der Lösung wurde lyophilisiert. Die Substanz war im DC. (A, B, C, K) einheitlich, Ausbeute 69%. – UV. (Wasser, Ammoniumsalz): 301 S; Max. 272; Min. 247;  $\epsilon^{272}/\epsilon^{301} = 2,2$ ,  $\epsilon^{272}/\epsilon^{247} = 1,6$ .

Nach der HPLC.-Analyse (System B) war dieses Material relativ rein (Fig. 2). Das nach Lyophilisieren der Hauptspitze erhaltene Material ergab  $\epsilon^{271}/\epsilon^{301} = 1,85$ . Es wurde später für den enzymatischen Abbau verwendet.

8. Herstellung von (MeOTr)M<sub>d</sub>p<sup>an</sup>C<sub>d</sub> – 8.1. Synthese analog der von (MeOTr)T<sub>d</sub>pT<sub>d</sub> (s. 3.1.). Bei einem MeOH-Anteil von 5–6% wurde (MeOTr)M<sub>d</sub>p<sup>an</sup>C<sub>d</sub> in einer Ausbeute von 50% eluiert. Bei einem MeOH-Anteil von 6% wurde mit den beiden letzten Produkt enthaltenden Fraktionen <sup>an</sup>C<sub>d</sub> miteluiert. (MeOTr)M<sub>d</sub>p<sup>an</sup>C<sub>d</sub> war im DC. (D, E) einheitlich. – UV. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 94:6): 300 S; Max. 288; Min. 247;  $\epsilon^{288}/\epsilon^{247} = 2,0$ .

Die bei einem MeOH-Anteil von 4% eluierten Nebenprodukte (19% der theor. Ausbeute) waren trityl- und zuckerhaltig. – UV. gleiches Aussehen wie das von (MeOTr)M<sub>d</sub>p<sup>an</sup>C<sub>d</sub>;  $\epsilon^{288}/\epsilon^{247} = 1,84$ .

8.2. Mit 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) als Kondensationsmittel. Die Synthese von (MeOTr)M<sub>d</sub>p<sup>an</sup> erfolgte analog der Herstellung von (MeOTr)T<sub>d</sub>pT<sub>d</sub> (s. 5.1). Dann wurden 60 mg (0,077 mmol, Triäthylammoniumsalz) (MeOTr)M<sub>d</sub>p<sup>an</sup> und 31 mg (0,085 mmol) <sup>an</sup>C<sub>d</sub> zusammengegeben, 4mal mit Pyridin versetzt und i.HV. abgedampft. Der ölige Rückstand wurde in 1,5 ml

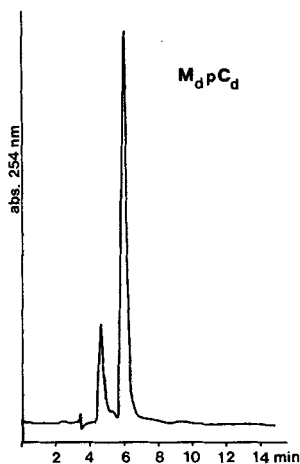


Fig. 2. HPLC. von M<sub>d</sub>pC<sub>d</sub> (4) (System B)

Pyridin aufgenommen und die entstandene klare, farblose Lösung mit 63 mg (0,212 mmol) MSNT versetzt. Nach 35 Min. wurde mit 0,13 ml ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung hydrolysiert und noch 15 Min. weitergerührt. Nachdem die Lösung mit 10 ml ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung versetzt worden war, wurde die entstandene Suspension mit  $\text{CHCl}_3$  ( $10 \times 10$  ml) extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten org. Phasen mit  $\text{MgSO}_4$ , Eindampfen und Entfernen des restlichen Pyridins durch Abdampfen mit Toluol, wurde der Rückstand auf einer Kieselgel-Säule mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und steigenden Mengen MeOH chromatographiert. Bei einem MeOH-Anteil von 6% wurden 2 DC.-reine Fraktionen eluiert, 19%  $(\text{MeOTr})\text{M}_d\varphi^{an}\text{C}_d$ . Die restlichen Produkt enthaltenden Fr. waren mit  $^{an}\text{C}_d$  verunreinigt. – UV. ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  92:8): 300 S; Max. 288; Min. 247;  $\epsilon^{288}/\epsilon^{247} = 1,98$ .

8.3.  $(\text{MeOTr})\text{M}_d\varphi^{an}\text{C}_d$  Die Abspaltung der Phosphatschutzgruppe in  $(\text{MeOTr})\text{M}_d\varphi^{an}\text{C}_d$  erfolgte mit (*E*)-*p*-Nitrobenzaldehydoxim (s. 6.1). Die Trennung erfolgte mittels präp. DC. ( $20 \times 20$  cm, Kieselgel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  3:2). Das Produkt war im DC. (A, B, C, K) einheitlich. – UV. (MeOH): 302 S; Max. 278; Min. 246.

9. Enzymatische Spaltungen. – 9.1. Spaltungen von  $p\beta\text{M}_d$  – 9.1.1. Mit alkalischer Phosphatase. Aus 1,2 mg lyophilisiertem  $p\beta\text{M}_d$  und 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  wurde eine Lösung hergestellt. Davon wurden 30  $\mu\text{l}$  mit 25  $\mu\text{l}$  Puffer (Pufferlösung: 4 ml 0,05M  $\text{MgCl}_2$  + 8 ml 0,5M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 9,2) + 88 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) und 25  $\mu\text{l}$  Enzymlösung 35 Min. bei  $37^\circ$  inkubiert. Von dieser Lösung wurden 6  $\mu\text{l}$  auf eine DC.-Platte aufgetragen und die Abspaltung des Phosphats im System A überprüft.

9.1.2. Mit Phosphodiesterase I mit 5'-Nucleotidasenaktivität. Bei  $37^\circ$  wurden 20  $\mu\text{l}$  Substratlösung, 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  und 10  $\mu\text{l}$  Enzymlösung 35 Min. inkubiert. Von dieser Lösung wurden 4  $\mu\text{l}$  auf DC.-Platten aufgetragen und die Abspaltung in den Systemen A und C überprüft.

9.2. Spaltungen von  $pa\text{M}_d$  mit alkalischer Phosphatase und Phosphodiesterase I mit 5'-Nucleotidasenaktivität. Diese Spaltungen wurden analog zu 9.1.1 und 9.1.2 vorgenommen, jedoch mit einer Inkubationszeit von 50 Min. Während die alkalische Phosphatase das Nucleotid vollständig zum Nucleosid abbaute, war mit Phosphodiesterase I (*C. atrox*) kaum ein Abspaltungsprodukt zu sehen.

9.3. Spaltung von  $T_{dp}T_{dp}\text{M}_d$  (2). Es wurden 5 mg Phosphodiesterase I in 1 ml 0,33M Tris-Puffer von pH 9,3 gelöst. Zu 50  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden 1,2 OD Nucleotid in 15  $\mu\text{l}$  Wasser gegeben. Nach 30 Min. stehengelassen bei  $37^\circ$  wurde das resultierende Gemisch direkt einer HPLC.-Analyse unterworfen. Im System A war kein Oligonucleotid nachweisbar. Im System C waren lediglich die erwünschten Monomeren vorhanden (Fig. 3).

9.4. Spaltung von  $M_d\varphi\text{C}_d$  (4). Das gleiche Verfahren wurde verwendet. Die HPLC.-Analyse mit System D zeigte ausschliesslich die erwünschten Produkte (Fig. 4).

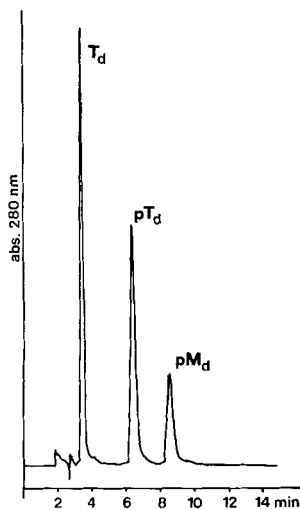


Fig. 3. Trennung der Spaltprodukte von  $T_{dp}T_{dp}\text{M}_d$  (2) (System C)

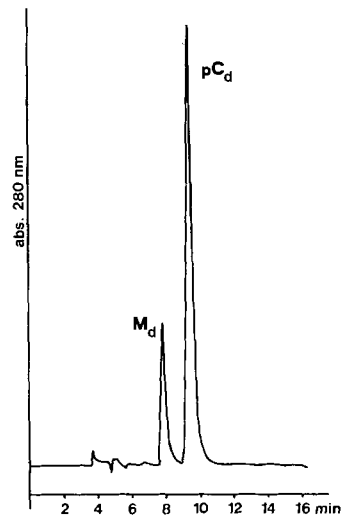


Fig. 4. Trennung der Spaltprodukte von  $M_d\varphi\text{C}_d$  (4) (System D)

10. *Rf*-Werte im DC.

Substanz	Lösungsmittelsystem					
	A	B	C	D	E	K
M <sub>d</sub> (Bz)				0,26	0,59	
(MeOTr)M <sub>d</sub> (Bz)				0,53	0,82	
(MeOTr)T <sub>d</sub> φT <sub>d</sub>				0,31	0,58	
(MeOTr)T <sub>d</sub> φT <sub>d</sub> φM <sub>d</sub>				0,18	0,49	
(MeOTr)T <sub>d</sub> φT <sub>d</sub> φM <sub>d</sub> (Bz)				0,35	0,63	
(MeOTr)M <sub>d</sub> φ <sup>an</sup> C <sub>d</sub>				0,31	0,55	
(MeOTr)M <sub>d</sub> p <sup>an</sup> C <sub>d</sub>	0,67	0,81	0,61			0,52
(MeOTr)M <sub>d</sub> pC <sub>d</sub>	0,58	0,74	0,60			0,46
M <sub>d</sub> pC <sub>d</sub>	0,54	0,54	0,53			0,17
(MeOTr)T <sub>d</sub> pT <sub>d</sub> pM <sub>d</sub>	0,52	0,78	0,58			0,43
T <sub>d</sub> pT <sub>d</sub> pM <sub>d</sub>	0,48		0,58			0,17

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. Waldmeier, S. De Bernardini, C.A. Leach & Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta*, **65**, 2475 (1982).
- [2] H.-D. Schneider, Dissertation, Basel 1981.
- [3] a) J.D. Watson & F.H.C. Crick, *Nature* **171**, 737 (1953); b) *idem*, *ibid* **171**, 964 (1953).
- [4] N. Cerletti, Dissertation, Basel 1976.
- [5] IUPAC-IUB, Commission on Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **40**, 277 (1974).
- [6] E. Volz & Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **61**, 2579 (1978).
- [7] F. Waldmeier & Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **61**, 1648 (1978).
- [8] N. Cerletti & Ch. Tamm, *Heterocycles* **5**, 245 (1976).
- [9] N. Cerletti & Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **60**, 1182 (1977).
- [10] M. Wachtl, Dissertation, Basel 1980.
- [11] A. Kössel & H. Seliger, «Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe», **32**, Springer-Verlag Wien/New York 1975, S. 298 ff.
- [12] P. Kohler, E. Volz, U. Séquin & Ch. Tamm, in 'Nucleic Acid Chemistry', Part 1, ed. L.B. Townsend, R.S. Tipson, Wiley-Interscience 1978, S. 283.
- [13] P. Kohler, M. Wachtl & Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **63**, 2488 (1980).
- [14] M. Yoshikawa, T. Kato & T. Takenishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **42**, 3505 (1969).
- [15] P. Cashion, K. Porter, T. Cadger, G. Sathe, T. Tranquilla, H. Notman & E. Jay, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 3769.
- [16] H. Schaller, C. Weimann, B. Lerch & H.G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3821 (1963).
- [17] a) N. Katagiri, K. Itakura & S.A. Narang, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1974**, 325; b) *idem*, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 7332 (1975).
- [18] G. Höfle, W. Steglich & H. Vorbrüggen, *Angew. Chem.* **90**, 602 (1978).
- [19] J. Stawinski, T. Hozumi, S.A. Narang, C.P. Bahl & R. Wu, *Nucl. Acids Res.* **4**, 353 (1977).
- [20] R.W. Adamiak, M.Z. Barciszewka, E. Biala, K. Grzeskowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, W.T. Markiewicz & M. Wiewiozowski, *Nucl. Acids Res.* **3**, 3397 (1976); A.K. Sood & S.A. Narang, *ibid.* **4**, 2757 (1977).
- [21] J.B. Chattopadhyaya & C.B. Reese, *Nucl. Acids Res.* **8**, 2039 (1980).
- [22] K.K. Ogilvie, S.L. Beaucauge & D.W. Entwistle, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 1255.
- [23] K. Itakura, N. Katagiri, C.P. Bahl, R.H. Wightman & S.A. Narang, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 7327 (1975).
- [24] C.A.A. van Boeckel & J.H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **21**, 3705 (1980).
- [25] H.G. Khorana, A.F. Turner & J.P. Vizsolyi, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 686 (1961).
- [26] H. Weber & H.G. Khorana, *J. Mol. Biol.* **72**, 251 (1972).
- [27] F. Waldmeier, unveröffentlichte Versuche.
- [28] P. Cashion, H. Notman, G. Sathe, T. Cadger & T. Tranquilla, *J. Chromatogr.* **136**, 159 (1977).
- [29] P. Bühlmayer, G. Graf, F. Waldmeier & Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **63**, 2469 (1980).
- [30] M. Dizdaroglu & W. Hermes, *J. Chromatogr.* **171**, 321 (1979).