

199. Nucleotide, XVII¹⁾

Synthese von homogenen Adenosyl-3', 5'-Oligomeren nach dem Phosphotriester-Verfahren²⁾

von Dieter Flockerzi, Eugen Uhlmann und Wolfgang Pfeleiderer*

Fakultät für Chemie der Universität Konstanz, Postfach 5560, D-7750 Konstanz

(22. VI. 83)

Nucleotides, XVII. Synthesis of Homogeneous Adenosyl-3',5'-oligomers by the Phosphotriester Method

Summary

The chemical synthesis of the fully protected trimer **12**, the tetramers **11** and **23** as well as the pentamer **14** was achieved in preparative scales starting from the fully blocked adenosine-3'-phosphotriesters **1**, **2**, and *N*⁶-benzoyl-2',3'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosine (**6**). All intermediates and end products have been isolated, purified and characterized by elemental analyses, UV, and CD spectra. Deprotection of the various blocking groups proceeds without difficulties to afford the free trimeric, tetrameric, and pentameric oligoadenylates **15**, **16**, and **24** in high yields.

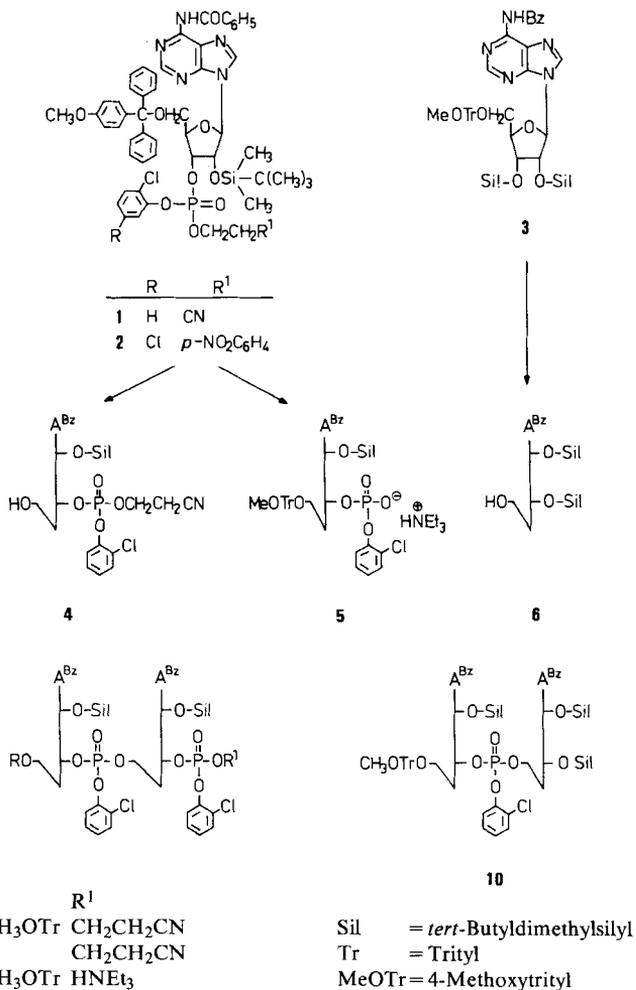
1. Einleitung. – Die chemische Oligonucleotid-Synthese hat in jüngster Zeit einen viel beachteten Aufschwung erfahren, der in methodischen Verbesserungen des Phosphotriester-Verfahrens [4–6] begründet liegt. Mit der Synthese der vollgeschützten Adenosin-3'-phosphotriester **1** und **2** [7] hatten wir wertvolle Ausgangssubstanzen zugänglich gemacht, die als Basis für einen systematischen Aufbau von homogenen Adenosin-Oligonucleotiden sehr geeignet schienen. Unsere Aufmerksamkeit richtete sich dabei in erster Linie auf die Kondensationsschritte unter Bildung der Internucleotid-Bindungen. Darüber hinaus besaßen diese Untersuchungen gewissen Modellcharakter für analoge Umsetzungen mit anderen Mononucleotid-Einheiten.

2. Synthesen. – Ausgehend vom *N*⁶-Benzoyl-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-*O*-(4-methoxytrityl)adenosin-3'-(*o*-chlorphenyl) (β -cyanäthyl)phosphat **1** wurden zunächst nach bekannten Verfahren [7] einmal die Monomethoxytrityl-Gruppe zum *N*⁶-Benzoyl-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl) (β -cyanäthyl)phosphat **4** und zum anderen die Cyanäthyl-Gruppe zum Triäthylammonium-[*N*⁶-benzoyl-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-*O*-(4-methoxytrityl)adenosin-3'

¹⁾ Teil XVI: [1].

²⁾ Aus den Dissertationen von D. F. [2] und E. U. [3].

Schema 1



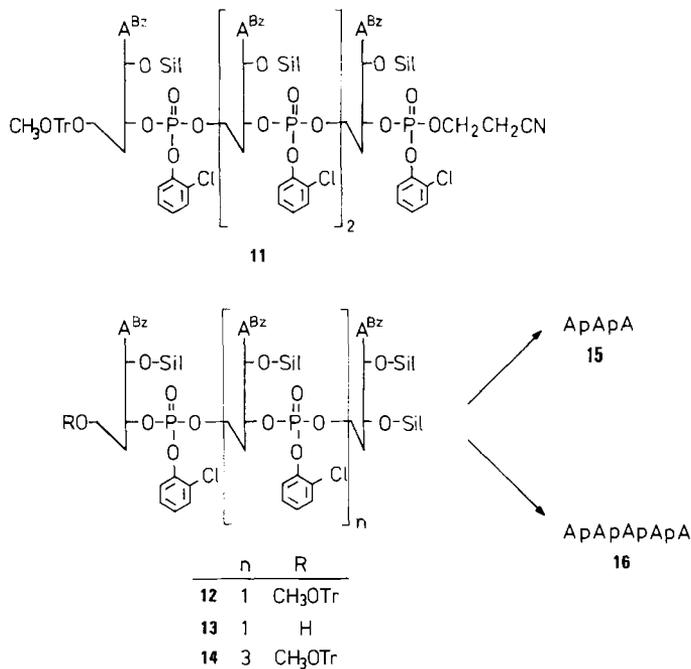
(*o*-chlorphenyl)phosphat] **5** abgespalten. Als weitere Reaktionskomponente diente für das 3'-Ende der Oligonucleotid-Kette das *N*⁶-Benzoyl-2',3'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin (**6**), das aus der Detritylierung des entsprechenden 5'-*O*-(4-Methoxytrityl)-Derivates **3** [8] stammte.

Bei den Kondensationsreaktionen zwischen **5** und **4** sowie **5** und **6**, die zeitlich in der raschen Entwicklung der Phosphotriester-Methode etwas zurückliegen, wurde das 2,4,6-Triisopropylbenzoylsulfonyl-(4-nitroimidazol) (TPS-NI) [9] als Kondensationsmittel eingesetzt, das im Gegensatz zu dem heute vielfach verwendeten 2,4,6-Triisopropylbenzoylsulfonyl- (TPS-NT) [10] und Mesitylensulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazolid (MS-NT) [11] [12] sowie 8-Chinolinsulfonylchlorid/3-Nitro-1,2,4-

triazol-Gemisch [13] relativ langsam aber doch sehr einheitlich reagiert. Bei äquimolarem Einsatz der Ausgangskomponenten wurden die Dimeren **7** und **10** nach 3–5-tägiger Reaktionszeit bei Raumtemperatur in Ausbeuten von 75% bzw. 86% isoliert. Um anschliessend die Ausgangskomponenten für eine Blockkondensation nach dem (2+2)-Bauprinzip zu erhalten, wurde **7** durch Triäthylamin-Behandlung in Pyridin/Wasser in den 3'-Phosphodiester **9** mit 96proz. Ausbeute übergeführt, während Detritylierungsversuche an **7** mit 80proz. Essigsäure nur 80% an dem 5'-OH-Dinucleosid-bis(phosphotriester) **8** ergab. Als Nebenprodukte fiel ein Gemisch aus teilweise und völlig debenzoylierten Dimeren an, wie durch chromatographische Trennung und NMR-Charakterisierung festgestellt wurde. Die Abspaltung in einer 2proz. Lösung von *p*-Toluolsulfonsäure in Methylendichlorid/Methanol (4:1) bei -8° gestaltete sich dann wesentlich besser und lieferte 93% analysenreines **8**. Die Blockkondensation von **8** und **9** zum tetrameren Adenosin-3',5'-phosphotriester **11** wurde mit Hilfe von TPS-NI auf 60% isolierte Reinausbeute optimiert, wobei vermutlich die lange Reaktionszeit und eine gewisse Instabilität der Cyanäthyl-Schutzgruppe unter den gewählten Reaktionsbedingungen ausbeutevermindernd wirkte.

Am Beispiel der Synthese des Adenosin-Pentameren **16** sollte die Frage geklärt werden, ob ein endständiges Nucleosid mit einer 2',3'-Bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-Schutzgruppenkombination bessere Kondensationsergebnisse liefert und inwieweit sich ferner der Einfluss der endständigen hydrophoben *tert*-Butyl-

Schema 2



dimethylsilyl-Gruppen auf das chromatographische Verhalten längerer Oligonucleotide auswirkt.

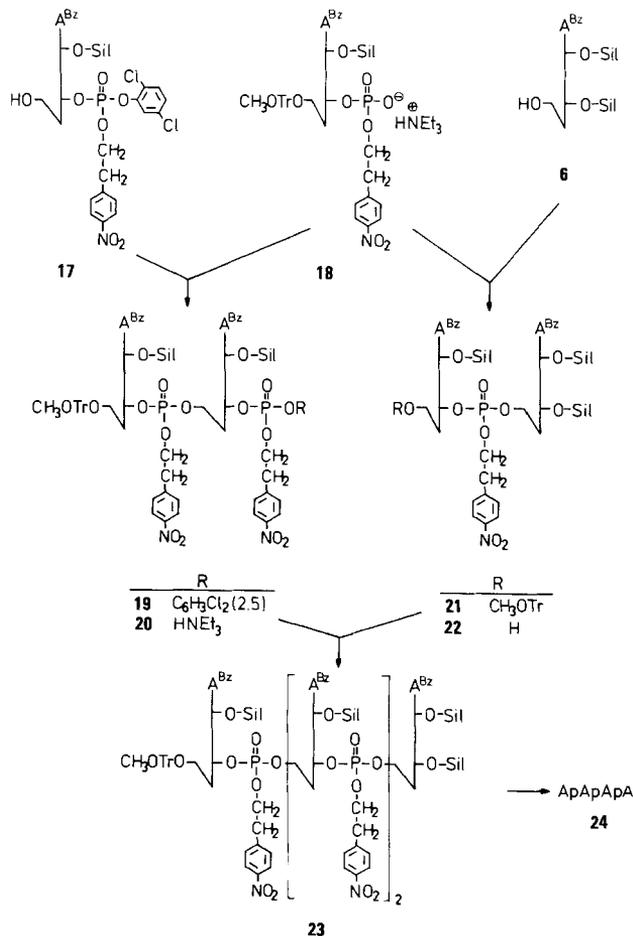
Bei der Darstellung des homogenen tetrameren Adenosin-3'-phosphotriesters **11** wurde das Prinzip einer rationalen Syntheseplanung gezeigt. Für den Pentaadenosin-3',5'-tetraphosphotriester **15** sind – ausgehend von den monomeren Bausteinen **4–6** – auf der Basis eines 3',5'-Aufbaus in konvergierenden Synthesen entweder eine (3+2)- oder eine (2+3)-Blockbauweise möglich. Die schematischen Synthesewege lassen klar erkennen, dass die (2+3)-Kombination mehrere Vorteile hat. Bei identischen Ausgangsbausteinen sind hier nur fünf statt sieben Reaktionsschritte erforderlich, ausserdem kann die dimere Phosphodiester-Komponente **9** in zwei Kondensationsschritten eingesetzt werden und schliesslich enthalten die Kondensations-Partner ab der Stufe des Trimeren **12** keine Cyanäthyl-Funktion mehr.

Die erwartete günstige Reaktionsbeeinflussung zeigte sich schon bei der Kondensation des dimeren Adenosinphosphodiesters **9** mit *N*⁶-Benzoyl-2',3'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin (**6**) zum vollgeschützten Trimeren **12**, das nach dreitägiger Reaktionszeit unter dem Einfluss von TPS-NI mit 87proz. Ausbeute gewonnen wurde. Erheblich problematischer war dann allerdings die Methoxytrityl-Abspaltung mit 1proz. Trifluoressigsäure. Infolge der parallel laufenden Debenzoylierung und einer aufwendigen chromatographischen Isolierung und Reinigung wurde das gewünschte trimere 5'-OH-ApApA **13** nur mit 60proz. Ausbeute gewonnen. Seine erneute Kondensation mit der Dimeren-Komponente **9** zum Pentameren **14** verlief dann jedoch sehr glatt, denn schon nach 2tägiger Reaktionszeit war die Umsetzung beendet und **14** wurde mit 87proz. Ausbeute gewonnen. Die Schutzgruppenabspaltungen bei **12** und **14** wurden in der Reihenfolge Oximat-Spaltung [11] [14] zur Phosphodiester-Funktion, Desilylierung mittels F⁻-Ionen, NH₃-Behandlung zur Entbenzoylierung und Detritylierung in 80proz. Essigsäure durchgeführt und lieferten nach *DEAE-Sephadex*-Chromatographie das freie trimere ApApA (**15**) bzw. pentamere ApApApApA (**16**) mit 78- bzw. 81proz. Ausbeute.

Mit dem *p*-Nitrophenyläthyl-Rest als neuer Phosphat-Schutzgruppe [15] bot sich eine zweite Möglichkeit, analoge Adenosin-Oligonucleotide nach dem Phosphotriester-Verfahren aufzubauen. Das *N*⁶-Benzoyl-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-*O*-(4-methoxytrityl)adenosin-3'-(2,5-dichlorphenyl)[2-(4-nitrophenyl)äthyl]phosphat [7] (**2**) diene als allgemein verwendbare Ausgangsverbindung, die unter Säureeinwirkung zu **17** detrityliert und mit Hilfe der Oximat-Spaltung [11] [14] in den entsprechenden (*p*-Nitrophenyläthyl)-phosphodiester [7] **18** übergeführt werden konnte.

Als weitere Komponente für das 3'-Ende der Oligonucleotid-Kette diene erneut das *N*⁶-Benzoyl-2',3'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin (**6**), das zunächst mit dem Phosphodiester **18** in Gegenwart von TPS-NI als Kondensationsmittel mit 59proz. Ausbeute das *N*⁶-Benzoyl-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-*O*-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'-[*O*²-(2-[4-nitrophenyl]äthyl)-5']-*N*⁶-benzoyl-2',3'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin (**21**) lieferte, wogegen dieselbe Umsetzung mit TPS-NT eine Ausbeutesteigerung auf 81% erbrachte. Bei der Darstellung des Diadenosin-bis(phosphotriesters) **19** aus äquimolaren Mengen **17** und **18** unter der Mitwirkung

Schema 3



von TPS-NT traten experimentelle Schwierigkeiten auf: Infolge der sehr ähnlichen chromatographischen Eigenschaften der nicht vollständig umgesetzten 5'-OH-Komponente **17** und des Reaktionsproduktes **19** wurde nach verlustreicher Trennung und Reinigung **19** nur eine 60proz. Ausbeute erhalten. Die Verseifung des 3'-ständigen 2,5-Dichlorphenyl-Restes mit *p*-Nitrobenzaloxim/Triäthylamin zum entsprechenden Phosphodiester **20** verlief mit 92proz. Ausbeute und die Detrylierung von **21** mit 1proz. Trifluoressigsäure in Chloroform zu **22** gelang mit 88%. Die anschliessende (2+2)-Blockkondensation in Gegenwart von TPS-NT verlief bei Anwendung von äquimolaren Mengen **20** und **22** mit 73proz. und bei Einsatz von 1–2 Äquivalenten **20** mit 79proz. Ausbeute zum reinen, vollständig geschützten Tetrameren **23**. Die Totalentschützung dieser Substanz zu **24** erfolgte in der Reihenfolge DBU in Pyridin, Tetrabutylammoniumfluorid, konz. Ammoniak und 80proz.

Essigsäure und ergab nach *DEAE-Sephadex*-Chromatographie im 0.001–0.5 M TBK-Puffer-Gradienten aus dem Hauptpeak 90% Ausbeute.

3. Physikalische Eigenschaften. – Zur Charakterisierung der verschiedenen völlig und partiell geschützten Zwischenprodukte wurden CHN-Analysen durchgeführt sowie UV-Absorptionsspektren in Methanol aufgenommen. Darüber hinaus interessierten uns die CD-Spektren der vollblockierten Tri- (**12**), Tetra- (**23**) und Pentameren (**14**) in Methanol im Vergleich zu ihren entschützten Basismolekülen **15**, **24** und **16**, die in 1 M NaCl-Lösung/0.1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7 (1:1) gemessen wurden. Letztere zeigen eine gute Übereinstimmung mit Literaturdaten [16] und lassen als Charakteristikum eine Exciton-Aufspaltung erkennen, die den langwelligen Übergang in Form einer Hysteresis-Kurve als nahezu symmetrisches Paar positiver und negativer Extrema mit dem Wendepunkt im UV-Absorptionsmaximum in Erscheinung treten lässt. Die durch Schutzgruppen blockierten Oligomeren **12**, **14** und **23** zeigen demgegenüber ein normales Verhalten und weisen als langwelligen Übergang eine stark negative Elliptizität auf (*Tabelle*). Damit schliessen sich ihre chiroptischen Eigenschaften an die des Adenosins und AMP an, was einem fehlenden «Stacking»-Effekt der Purinbasen und einem geringen Einfluss der verschiedenen Schutzgruppen bzw. der Chiralitätszentren an den P-Atomen gleichkommt.

Tabelle. *Spektrale Daten von Oligoadenylaten*^{a)}

Verbindung	UV-Absorptionsspektren				CD-Spektren bei 25°			
	λ_{\max} [nm]		l g ϵ		λ [nm]		$\Theta \cdot 10^{-3}$	
13	230	280	4,73	4,80	230	278	+ 22,0	– 29,1
24		278		5,03	230	278	+ 47,2	– 55,1
16	[230] ^{b)}	280	[4,91] ^{b)}	5,02	232	278	+ 60,6	– 74,0
15		257		4,58	250	268	– 64,1	+ 59,7
25		257		4,68	250	267	– 117,3	+ 80,8
17		257		4,77	250	267	– 120,2	+ 126,2

^{a)} Lösungsmittel für **12**, **14**, **23**: MeOH; Lösungsmittel für **15**, **16**, **24**: 1 M NaCl-Lösung/0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7 (1:1). ^{b)} Schulter.

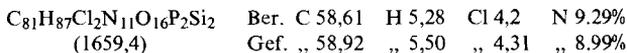
Wir danken der *Studienstiftung des Deutschen Volkes* und dem *Fonds der Chemischen Industrie* für je ein Stipendium, Frau *M. Bischler* für die Aufnahme der UV- und CD-Spektren sowie Frau Dr. *R. Charubala* für ergänzende Experimente und Charakterisierungen.

Experimenteller Teil

1. Allgemeines. – Die Schmelzpunkte (Smp.) sind nicht korrigiert. Das Einengen und Eindampfen von Reaktions- und Extraktionslösungen wurde stets im Rotationsverdampfer vorgenommen. Der verwendete Petroläther hatte den Siedebereich 50–70°. DC: Dünnschichtfolien *Cellulose F 1440 LS 254* und *Kieselgel F 1500 LS 254* der Fa. *Schleicher & Schüll*. Präp. Schichtchromatographie: *Kieselgel PF₂₅₄* der Fa. *Merck*, Schichtdicke 2 mm. Säulenchromatographie: *Merck Kieselgel 60* (Korngrösse 0,063–0,2 mm) für «handgepackte» Säulen [8] und *Kieselgel LiChroPrep Si 60* (15–25 μ) für die präparativen Fertigsäulen vom Type B (250×24 mm) und Typ C (400×39,5 mm), deren Präparierung, Konditionierung und Charakterisierung durch die Bestimmung der Bodenzahl N ausführlich in der Diplomarbeit *D. Flockerzi*, Univ. Stuttgart 1978 [7], beschrieben ist. Die Mitteldruckchromatographie

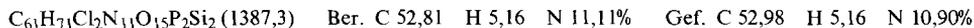
wurde im allgemeinen bei 8-10 bar durchgeführt. Das Trocknen der Substanzen erfolgte im Vakuum-Trockenschrank Büchi-TO 50 bei RT oder mässig erhöhter Temp. über P₂O₅. UV-Absorptionsspektren und CD-Spektren: Cary-Recording-Spektrometer, Modell 118 bzw. 115/160, der Fa. Applied Physics. NMR-Spektren: Bruker-Gerät HFX-90 und Jeol-Gerät JNM-MH-100³). Abkürzungen: TBK = Triäthylammoniumhydrogencarbonat, TPS-Cl = 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid, TPS-NI = 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäure-(4-nitroimidazolid), TPS-NT = 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäure-(3-nitro-1,2,4-triazolid), GFS-Kieselgelsäule = «Great-flow-system»-Säule.

2. Synthesen von Nucleotiden und Oligonucleotiden. - 2.1. N⁶-Benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-adenosin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (7). N⁶-Benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (5, 0,73 g, 1,00 mmol) und Triethylammonium-[N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] (6, 1,6 g, 1,10 mmol) werden 2mal mit je 5 ml abs. Pyridin bis zum Aufschäumen i.V. bei 30° (Badtemp.) eingengt. Zum Rückstand gibt man eine Lösung von 0,42 g (1,10 mmol) TPS-NI in 10 ml abs. Pyridin und engt nach völliger Lösung auf ein Volumen von 5 ml ein. Man rührt 48 Std. bei RT., gibt nochmals 76 mg (0,20 mmol) TPS-NI zu und lässt weitere 12 Std. reagieren. Der Ansatz wird in 200 ml CHCl₃ aufgenommen und 3mal mit je 200 ml 0,1M Phosphatpuffer pH 7 ausgeschüttelt. Die org. Phase wird nach Trocknen mit Na₂SO₄ i.V. eingedampft, in 6 ml CH₂Cl₂ gelöst und über eine Kieselgelsäule (1 × 10 cm) mit 1 l CH₂Cl₂/MeOH (97:3) vorchromatographiert. Die Hauptfraktion wird erneut eingengt, der Rückstand in 6 ml CH₂Cl₂ gelöst und je zur Hälfte auf eine Präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ C (N = 9000) gegeben. Man chromatographiert bei einem Durchflussvolumen von 30 ml/Min. mit CH₂Cl₂/Petrolether/EtOH-Gemischen folgender Zusammensetzungen: 1 l (100:100:1), 1 l (100:100:1,5), 2 l (100:100:2,25) und 1 l (100:100:3). Die Hauptfraktion mit einem Peak-Maximum nach 128 Min. wird i.V. eingedampft, der Rückstand in 4 ml CH₂Cl₂ gelöst und dann langsam unter Rühren in 300 ml Hexan getropft. Der abgeschiedene voluminöse Niederschlag wird über eine D4-Porzellanfritte abgesaugt und i.HV. über P₂O₅/Paraffin bei RT. getrocknet. Man erhält 1,231 g (75%) farbloses, amorphes Pulver. UV (MeOH): max. 230 (4,63), 280 (4,66). ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 2,81 (s, 2 H, CH₂CN); 3,52-3,77 (m, 5 H, 2 H-C(5') und OCH₃); 6,10 (t, J = 7, 2 H, H-C(1')); 6,80 (d, J = 9, 2 H, o-Anisyl-H); 8,06-8,28 (m, 2 H, H-C(2)); 8,61-8,80 (m, 2 H, H-C(8)); 8,98 (s, 2 H, NH).



2.2. N⁶-Benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (8). a) In 20 ml 80proz. AcOH werden 1,152 g (0,70 mmol) 7 10 Std. bei RT. gerührt. Man versetzt mit 200 ml CHCl₃ und schüttelt dann 3mal mit je 100 ml 1M Phosphatpuffer pH 7 aus. Die mit Na₂SO₄ getrocknete org. Phase wird zum Sirup eingengt, der Rückstand in 4 ml CH₂Cl₂ gelöst, auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (2 × 10 cm) gegeben und mit 500 ml CH₂Cl₂/MeOH (96:4) vorchromatographiert. Das Eluat zwischen 150-500 ml wird i.V. eingedampft, erneut in wenig CH₂Cl₂ gelöst und auf eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N = 7000) gegeben. Man chromatographiert bei einem Durchflussvolumen von 18 ml/Min. mit CH₂Cl₂/EtOH-Gemischen folgender Zusammensetzungen: 1 l (98,5:1,5), 1 l (98,3:1,7), 2 l (98:2) und 1 l (97:3). Das gesuchte Reaktionsprodukt wird mit einer Retentionszeit zwischen 170 und 280 Min. eluiert. Diese Fraktion wird i.V. zu einem farblosen, festen Schaum eingedampft und liefert nach einwöchigem Trocknen bei 50°/10⁻³ Torr 0,78 g (80%) chromatographisch reines Produkt.

b) Mit 2,1 ml einer gekühlten Lösung von 2 g p-TsOH in 100 ml CH₂Cl₂/MeOH (4:1) werden 0,133 g (0,080 mmol) 7 versetzt und 5 Std. bei -8° stehengelassen. Man verdünnt mit 50 ml CHCl₃, schüttelt mehrmals mit 0,01M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase mit Na₂SO₄ und engt anschliessend ein. Der Rückstand wird wie voranstehend beschrieben chromatographisch gereinigt. Das erhaltene Produkt wird in wenig CH₂Cl₂ gelöst und unter Rühren in 200 ml Hexan getropft. Der Niederschlag liefert nach Trocknen 103 mg (93%) farbloses Pulver. UV (MeOH): max. 234 (4,43); 280 (4,63). ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 2,73-2,87 (m, 2 H, CH₂CN); 5,94-6,15 (m, 3 H, H-C(1') und HO-C(5')); 8,23 (s, 2 H, H-C(2)); 8,78 und 8,82 (2 s, 2 H, H-C(8)); 8,96 und 9,01 (2 s, 2 H, NH).



³) Es werden jeweils nur einige charakteristische Signale aufgeführt.

2.3. *Triäthylammonium-[N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat* (9). Bei RT. werden 0,232 g (0,140 mmol) 7 mit 5 ml Pyridin, 5 ml Et₃N und 0,5 ml H₂O 1,5 Std. gerührt. Man engt i.V. ein, dampft noch 3mal mit je 20 ml Toluol ein, bringt den Rückstand, gelöst in wenig CH₂Cl₂, auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (1×10 cm) und chromatographiert zunächst mit 500 ml CH₂Cl₂/MeOH (4:1) und anschliessend mit 800 ml CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N (100:30:25). Das Hauptprodukt wird gegen Ende eluiert und durch Einengen als fester Schaum gewonnen. Man dampft mehrmals mit Toluol i.V. ein, nimmt den Rückstand in CHCl₃ auf und tropft in 400 ml Hexan unter Rühren ein. Der farblose Niederschlag ergibt nach Trocknen bei 50°/10⁻³ Torr über P₂O₅/Paraffin 0,23 g (96%) farblores Pulver. UV (MeOH): max. 230 (4,63); 279 (4,65). ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 1,24 (t, J=7, 9 H, N(CH₂CH₃)₃); 2,97 (q, J=7, 6 H, N(CH₂CH₃)₃); 3,76 (s, 3 H, OCH₃); 6,04–6,26 (m, 2 H, H–C(1')); 8,23 und 8,39 (2 s, 2 H, H–C(2)); 8,59 und 8,77 (2 s, 2 H, H–C(8)).

C₈₄H₉₉Cl₂N₁₁O₁₆P₂Si (1707,8) Ber. C 59,08 H 5,84 N 9,02% Gef. C 58,32 H 5,61 N 8,89%

2.4. *N⁶-Benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2',3'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin* (10). *N⁶-Benzoyl-2',3'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin* (0,300 g, 0,500 mmol) [8] (6) und 0,525 g (0,500 mmol) *Triäthylammonium-[N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat* [8] (5) werden in 3 ml absol. Pyridin gelöst und bei 40° i.V. zur Trockne eingeeengt. Nach Zugabe von 0,38 g (1,0 mmol) TPS-NI und 5 ml abs. Pyridin wird auf ca. 3 ml konzentriert und anschliessend 5 Tage bei RT. gerührt. Man löst das Reaktionsgemisch in 200 ml CHCl₃, schüttelt 3mal mit je 300 ml 0,1M Phosphatpuffer pH 7 aus und trocknet die org. Phase mit Na₂SO₄. Es wird eingeeengt, mehrmals mit Benzol eingedampft und der erhaltene Rückstand nach Lösen in wenig CH₂Cl₂ auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (2×20 cm) gegeben und mit 500 ml CH₂Cl₂ sowie anschliessend 2 l CH₂Cl₂/MeOH (98:2) chromatographiert. Die Produktfraktion wird erneut i.V. eingedampft und der Rückstand, gelöst in wenig CH₂Cl₂, über eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N=7000), mit CH₂Cl₂/MeOH (99:1) gereinigt. Nach Eindampfen der Produktfraktion und Trocknen des festen, aufgeschäumten Rückstandes (4 Tage über P₂O₅ bei 40°/10⁻³ Torr) erhält man 0,655 g (86%) farblosen Feststoff. UV (MeOH): max. 231 (4,62); 280 (4,66). ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 3,49 (m, 2 H, H–C(5')); 4,88 (m, 1 H, H–C(3')); 5,26 (m, 2 H, H–C(2')); 5,95 (d, J=4, 1 H, H–C(1')); 6,11 (d, J=7, 1 H, H–C(1')); 6,78 (d, J=9, 2 H, o-Anisyl-H); 8,13 und 8,21 (2 s, 2 H, H–C(2)); 8,62 und 8,77 (2 s, 2 H, H–C(8)); 8,93 (s, 2 H, NH).

C₇₈H₉₄ClN₁₀O₁₃PSi₃ Ber. C 61,22 H 6,19 Cl 2,32 N 9,15 P 2,02%
(1530,4) Gef. ,, 61,27 ,, 6,17 ,, 2,53 ,, 9,18 ,, 1,99%

2.5. *N⁶-Benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)-(2-cyanäthyl)phosphat* (11). Mit je 5 ml abs. Pyridin werden 0,423 g (0,250 mmol) 9 2mal bis zum Aufschäumen i.V. eingeeengt und 0,16 g (0,42 mmol) TPS-NI in 3 ml abs. Pyridin zugegeben. Anschliessend wird auf 1 ml Reaktionslösung konzentriert. Man setzt 0,319 g (0,230 mmol) 8, das ebenfalls 2mal mit je 5 ml abs. Pyridin eingeeengt worden war, gelöst in 5 ml abs. Pyridin, zu und konzentriert auf ca. 4 ml. Anschliessend wird 96 Std. bei RT. gerührt, dann nochmals 38 mg (0,1 mmol) TPS-NI zugegeben und wieder 24 Std. gerührt. Man verdünnt mit 200 ml CHCl₃, schüttelt 3mal mit je 200 ml 0,1M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase mit Na₂SO₄ und dampft 2mal unter Zusatz von je 50 ml Benzol i.V. ein, bis ein Schaum zurückbleibt. Der Rückstand wird in wenig CH₂Cl₂ gelöst, auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (2×10 cm) gegeben und nacheinander mit 250 ml CH₂Cl₂ und 1,5 l CH₂Cl₂/MeOH (98:2) vorchromatographiert. Die gegen Ende eluierte Hauptfraktion wird erneut eingeeengt, der Rückstand in 4 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und über eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N=7000), mit CH₂Cl₂/Petrolether/MeOH-Gemischen folgender Zusammensetzungen chromatographiert: 2 l (90:10:1), 2 l (90:10:1,5) und 1 l (90:10:1,8). Bei einem Durchflussvolumen von 30 ml/Min. beginnt die Elution des Hauptproduktes nach ca. 100 Min. Die Hauptfraktion wird zur Trockne eingeeengt, der farblose Rückstand in 2 ml CH₂Cl₂ gelöst und unter Rühren langsam in 20 ml Hexan getropft. Der abgeschiedene voluminöse Niederschlag wird 1 Woche bei 50°/10⁻³ Torr über P₂O₅/Paraffin getrocknet und ergibt 0,41 g (60%) farbloses Pulver. UV (MeOH): max. 230 (4,83);

280 (4,93). ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 1,77 (*t*, *J* = 7, 2 H, CH₂CN); 2,75–3,71 (*m*, 5 H, H–C(5') und OCH₃); 6,00–6,28 (*m*, 4 H, H–C(1')); 6,75 (*d*, *J* = 9, 2 H, *o*-Anisyl-H); 8,24 (*s*, 4 H, H–C(2)); 8,54 (*s*, 2 H, H–C(8)); 8,72 (*s*, 2 H, H–C(8)); 9,10 (*s*, 2 H, NH); 9,18 (*s*, 2 H, NH).

C ₁₃₉ H ₁₅₃ Cl ₄ N ₂₁ O ₃₀ P ₄ Si ₄	Ber. C 56,10	H 5,18	N 9,88	P 4,16%
(2975,9)	Gef. ,, 55,98	,, 5,16	,, 9,77	,, 4,31%

2.6. N⁶-Benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2',3'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin (**12**). Verbindung **9** (0,888 g, 0,520 mmol) und Verbindung **6** (0,324 g, 0,54 mmol) [8] werden 2mal mit je 3 ml abs. Pyridin i.V. eingedampft, dann in 6 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,31 g (0,82 mmol) TPS-NI versetzt. Das Reaktionsvolumen wird auf 4 ml konzentriert. Man rührt anschliessend 3 Tage bei RT., verdünnt mit 200 ml CHCl₃ und schüttelt 3mal mit je 200 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 aus. Die org. Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet und mehrmals unter Zusatz von Toluol i.V. eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird, in wenig CH₂Cl₂ gelöst, auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (1 × 15 cm) gegeben und nacheinander mit 250 ml CH₂Cl₂/Petrolether (2:1) und 2 l CH₂Cl₂/Petrolether/MeOH (1:1:0,1) vorchromatographiert. Die gegen Ende eluierte Hauptfraktion wird erneut eingengt, der erhaltene Schaum in wenig CH₂Cl₂ gelöst und zur Reinigung über eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N = 7000), nacheinander mit folgenden CH₂Cl₂/Petrolether/MeOH-Gemischen chromatographiert: 1 l (100:100:1), 2 l (100:100:1,3) und 1 l (100:100:1,5). Die Hauptfraktion wird i.V. eingedampft, wonach 0,985 g (87%) farbloser, fester Schaum erhalten werden. UV (MeOH): max. 230 (4,73); 280 (4,80). ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 3,72 (*s*, 3 H, OCH₃); 6,76 (*d*, *J* = 9, 2 H, *o*-Anisyl-H); 8,19–8,30 (*m*, 3 H, H–C(2)); 8,57 (*s*, 1 H, H–C(8)); 8,75 (*s*, 2 H, H–C(8)); 8,92, 9,01 und 9,16 (3 *s*, 3 H, NH).

C ₁₀₇ H ₁₂₇ Cl ₂ N ₁₅ O ₂₀ P ₂ Si ₄	Ber. C 58,72	H 5,85	Cl 3,24	N 9,60%
(2188,5)	Gef. ,, 58,60	,, 5,89	,, 3,49	,, 9,60%

2.7. N⁶-Benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2',3'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin (**13**). In 25 ml einer 1proz. Lösung von Trifluoressigsäure in abs. CH₂Cl₂ werden 0,788 g (0,360 mmol) **12** 45 Min. bei RT. gerührt. Nach ca. 1 Min. wird die orangefarbene Reaktionslösung mit 1,3 ml abs. MeOH versetzt, wobei fast vollständige Entfärbung stattfindet. Nach beendeter Reaktion wird mit wässr. ges. NaHCO₃-Lösung neutralisiert, in 250 ml CHCl₃ aufgenommen und 3mal mit je 200 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 ausgeschüttelt. Nach Trocknen der org. Phase mit Na₂SO₄ wird eingengt, der Rückstand, gelöst in wenig CH₂Cl₂, auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (2 × 10 cm) gegeben und mit 200 ml CH₂Cl₂ gefolgt von 1 l CH₂Cl₂/MeOH (95:5) vorchromatographiert. Die Produktfraktion wird eingedampft und – in wenig CH₂Cl₂ gelöst – auf eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N = 7000), gegeben. Man chromatographiert bei einem Durchflussvolumen von 18 ml/Min. zunächst mit 1 l CH₂Cl₂/MeOH (99:1), dann 1 l (98,8:1,2) und anschliessend mit 5 l eines linearen Gradienten (98,8–96,0:1,2–4,0). Das Hauptprodukt wird nach ca. 200 Min. eluiert. Nach Einengen i.V. und Aufschäumen des Rückstandes erhält man 0,414 g (60%) farblosen, amorphen Feststoff. UV (MeOH): max. 230 (4,61); 280 (4,81). ¹H-NMR (90 MHz, [D₆]DMSO): 6,05–6,11 (*m*, 3 H, H–C(1')); 7,10–7,61 (*m*, 15 H, arom. H); 8,00–8,09 (*m*, 6 H, *o*-Chlorphenyl-H); 8,71–8,75 (*m*, 6 H, H–C(2) und H–C(8)).

C ₈₇ H ₁₁₁ Cl ₂ N ₁₅ O ₁₉ P ₂ Si ₄	Ber. C 54,53	H 5,84	Cl 3,70	N 10,96%
(1916,2)	Gef. ,, 54,32	,, 5,78	,, 3,93	,, 10,95%

2.8. Adenosyl(3'-5')adenosyl(3'-5')adenosin (**15**). a) Das Trimer **12** (10,4 mg, 5,0 μmol) wird zur Abspaltung der *o*-Chlorphenyl-Gruppen mit 0,5 ml 0,3 M Tetramethylguanidinium-(4-nitrobenzaldehydoximat)-Lösung 24 Std. bei RT. gerührt. Nach 4 Std. setzt man 5 mg Tetramethylguanidin zu und engt nach beendeter Reaktion (ca. 24 Std.) ein. Der gelbe Rückstand wird, in wenig CHCl₃ gelöst, auf eine Kieselgelsäule (1 × 10 cm) gegeben und nacheinander mit 100 ml CHCl₃, 100 ml CHCl₃/MeOH (95:5), 60 ml 2-Propanol und 800 ml 2-Propanol/H₂O (9:1) entwickelt. Die 2-Propanol- und 2-Propanol/H₂O-Fractionen werden vereinigt und i.V. eingengt. Der Rückstand wird 3mal mit abs. Pyridin und dann bei 10⁻³ Torr 4 Std. getrocknet. Der erhaltene Rückstand wird zur Abspaltung der *tert*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppen mit 5 ml 0,5 M Tetrabutylammoniumfluorid in abs. Pyridin versetzt und 24 Std. bei RT. gerührt. Man engt ein, dampft 4mal mit je 10 ml H₂O ein und versetzt den Rückstand

mit 5 ml konz. NH_3 . Die gelbliche, trübe Lösung wird 24 Std. bei RT. gerührt, wonach die *N*-Benzoyl-Schutzgruppen vollständig abgespalten sind. Erneutes Einengen und 4maliges Eindampfen mit je 5 ml H_2O ist erforderlich, bevor 8 ml gekühlte 80proz. AcOH zur Detritylierung zugegeben werden. Man lässt 24 Std. im Kühlschranks bei ca. 8° stehen, engt i.V. ein und dampft anschliessend noch mehrmals mit H_2O ein, bis der Geruch nach AcOH verschwunden ist. Zur Reinigung wird der Rückstand in wenig H_2O gelöst, auf eine DEAE-Sephadex-Säule A-25 (1 × 62 cm) gegeben und mit TBK-Puffer pH 7.5 unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0,001–0,5M entwickelt. Man fängt 200 Fraktionen je 200 Tropfen (ca. 12 ml) auf und findet das Trimer **15** in den Fraktionen 34–41. Anschliessend wird i.V. eingengt, 10mal mit je 100 ml H_2O eingedampft und die Ausbeute UV-spektrometrisch, bezogen auf den Extinktions-Koeffizienten [16] $\epsilon = 37800$, zu 81% ermittelt.

b) Zur Entschützung von **13** werden 9,5 mg (5,0 μmol) analog voranstehender Vorschrift, jedoch ohne den Detritylierungs-Schritt mit AcOH, behandelt und dabei 83% **15** gewonnen. $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O): 5,59, 5,63 und 5,70 (3 d, $J = 2,5$, 3 H, H–C(1')); 7,66, 7,76 und 7,87 (3 s, 3 H, H–C(8)); 7,90, 7,96 und 7,97 (3 s, 3 H, H–C(2)).

2.9. N^6 -Benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'- $[\text{OP}^-(2\text{-chlorphenyl})]$]-5'- N^6 -benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'- $[\text{OP}^-(2\text{-chlorphenyl})]$]-5'- N^6 -benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'- $[\text{OP}^-(2\text{-chlorphenyl})]$]-5'- N^6 -benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'- $[\text{OP}^-(2\text{-chlorphenyl})]$]-5'- N^6 -benzoyl-2',3'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin (**14**). Verbindung **13** (0,307 g, 0,160 mmol) und Verbindung **9** (0,307 g, 0,180 mmol) werden 2mal mit je 2 ml abs. Pyridin i.V. eingedampft. Zum Rückstand gibt man 0,121 g (0,320 mmol) TPS-NI in 4 ml abs. Pyridin und konzentriert anschliessend bei 35° Badtemp. i.V. auf ca. 1 ml. Nach erneuter Zugabe von 2 ml abs. Pyridin wird 48 Std. bei RT. gerührt. Man versetzt dann mit 200 ml CHCl_3 , schüttelt 3mal mit je 200 ml 0,01M Phosphatpuffer pH 7 aus und trocknet die org. Phase mit Na_2SO_4 . Es wird eingengt, mehrmals mit Toluol i.V. eingedampft und anschliessend der aufgeschäumte Rückstand nach Lösen in wenig CH_2Cl_2 auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (2 × 20 cm) gegeben. Man entwickelt nacheinander mit 200 ml CH_2Cl_2 und 2 l $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5), die gegen Ende eluierte Produktfraktion wird eingengt, in CH_2Cl_2 gelöst und auf eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N = 7000), gegeben. Es wird mit 7 l eines linearen Gradienten aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Petrolether}/\text{MeOH}$ (100:100:0,8–2,2) und einer Durchflussgeschwindigkeit von 35 ml/Min. entwickelt, wobei das Produktmaximum bei einer Retentionszeit von 128 Min. erscheint. Die Hauptfraktion wird eingedampft und der Rückstand nach Lösen in 2 ml CHCl_3 langsam in 300 ml Hexan unter Rühren eingetropf. Der voluminöse, flockige Niederschlag wird 4 Tage bei 40°/10⁻³ Torr über $\text{P}_2\text{O}_5/\text{Paraffin}$ getrocknet und ergibt 0,841 g (86%) farblosen Feststoff. UV (MeOH): max. 230 (4,19); 280 (5,02). $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): 3,70 (m, 5 H, H–C(5') und OCH₃); 5,93–6,10 (m, 5 H, H–C(1')); 6,75 (d, $J = 9$, 2 H, *o*-Anisyl-H); 7,91–7,97 (m, 10 H, *o*-Benzoyl-H); 8,22–8,31 (m, 5 H, H–C(8)); 8,54 (s, 1 H, H–C(2)); 8,72 (s, 4 H, H–C(2)); 9,23 (m, 5 H, NH).

$\text{C}_{165}\text{H}_{193}\text{Cl}_4\text{N}_{25}\text{O}_{34}\text{P}_4\text{Si}_6$ (3504,8) Ber. C 56,55 H 5,55 N 9,99% Gef. C 56,32 H 5,59 N 9,71%

2.10. Adenosyl(3'-5')adenosyl(3'-5')adenosyl(3'-5')adenosin (**16**). Verbindung **14** (35 mg, 10 μmol) wird wie für **15** unter a) beschrieben, aber unter Verwendung der jeweils doppelten Volumina an Reagenzlösungen, jedoch gleichen Volumina für die chromatographischen Schritte, entschützt. Die Reinigung erfolgt wieder über eine DEAE-Sephadex-Säule A-25 (1 × 62 cm) mit TBK-Puffer pH 7,5 und Anwendung eines Gradienten von 0,001–0,75M. Das Pentamer **16** befindet sich in den Fraktionen 53–61. Die Ausbeute wird UV-spektrometrisch, bezogen auf den Extinktions-Koeffizienten [16] $\epsilon = 59000$, zu 78% bestimmt. $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O): 5,38, 5,43 und 5,53 (3 s, 3 H, H–C(1')); 5,65 und 5,68 (2 d, $J = 2,5$; 2 H, H–C(1')); 7,56, 7,65, 7,75, 7,87, 7,96 und 8,23 (6 s, 10 H, H–C(2) und H–C(8)).

2.11. N^6 -Benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'- $[\text{OP}^-(2\text{-[4-nitrophenyl]äthyl})]$]-5'- N^6 -benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin-3'-(2,5-dichlorphenyl)[2-(4-nitrophenyl)äthyl]phosphat (**19**). Triethylammonium-[N^6 -benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosin-3'-[2-(4-nitrophenyl)äthyl]phosphat [7] (**18**, 0,765 g, 0,700 mmol) wird 2mal mit je 5 ml abs. Pyridin eingengt, dann 0,602 g (0,700 mmol) N^6 -Benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin-3'-(2,5-dichlorphenyl)[2-(nitrophenyl)äthyl]phosphat [7] (**17**) und 8 ml abs. Pyridin zugesetzt. Nach Lösen wird i.V. zur Trockne eingengt, wobei die Substanzen einen festen Schaum bilden. Man setzt dann 0,533 g (1,40 mmol) TPS-NI in 12 ml abs. Pyridin zu, konzentriert auf 10 ml und rührt anschliessend 15 Std. bei RT. Nach Verdünnen mit 50 ml CHCl_3 wird nacheinander mit 25 ml 5proz.

NaHCO₃-Lösung und 25 ml H₂O gewaschen, die org. Phase mit MgSO₄ getrocknet und i.V. eingengt. Nach mehrmaligem Eindampfen des Rückstandes mit Benzol erhält man einen festen Schaum, der - in wenig CHCl₃ gelöst - auf eine 2,5-cm-Kieselgelsäule (75 g Kieselgel 60) gegeben und nacheinander mit 1,2 l CHCl₃ und 0,7 l CHCl₃/MeOH (99:1) chromatographiert wird. Die Hauptfraktion wird zur Trockne eingedampft und nach Lösen des Rückstandes in 4 ml CHCl₃ langsam unter Rühren in 75 ml Hexan getropft. Der abgeschiedene Niederschlag wird bei 50° i.V. über P₂O₅ getrocknet und ergibt 0,763 g (60%) farblosen Feststoff. UV (MeOH): 278 (4,78).

C₈₈H₉₄Cl₂N₁₂O₂₀P₂Si₂ (1828,8) Ber. C 57,79 H 5,18 N, 9,19% Gef. C 57,73 H 5,31 N 9,25%

17: ¹H-NMR (100 MHz, CDCl₃): 3,15 (*t*, 2 H, CH₂CH₂-C₆H₄-NO₂); 4,52 (*m*, 3 H, H-C(4') und OCH₂CH₂-C₆H₄-NO₂); 5,95 (*m*, 2 H, H-C(1')); 7,17-7,30 (*m*, 8 H, arom. H); 8,09 (*m*, 4 H, *o*-aromat. H); 8,17 (*s*, 1 H, H-C(2)); 8,75 (*s*, 1 H, H-C(8)); 9,48 (*s*, 1 H, NH).

18: ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 1,20 (*t*, 9 H, NH(CH₂CH₃)₃); 2,94 (*m*, 8 H, NH(CH₂CH₃)₃, CH₂CH₂-C₆H₄-NO₂); 3,70 (*s*, 3 H, OCH₃); 4,03 (*m*, 2 H, CH₂CH₂-C₆H₄-NO₂); 6,10 (*m*, 1 H, H-C(1')); 6,75 (*d*, *J*=9, 2 H, *o*-Anisyl-H); 8,16 (*s*, 1 H, H-C(2)); 8,68 (*s*, 1 H, H-C(8)); 9,22 (*br. s.*, 1 H, NH); 12,40 (*br. s.*, 1 H, NH).

19: ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 3,04 (*m*, 4 H, CH₂CH₂-C₆H₄-NO₂); 3,72 (*s*, 3 H, OCH₃); 4,4 (*m*, 8 H, H-C(4'), CH₂CH₂-C₆H₄-NO₂ und H-C(5')); 6,01 (*m*, 2 H, H-C(1')); 6,77 (*d*, *J*=9, 2 H, *o*-Anisyl-H); 7,0-7,6 (*m*, 25 H, arom. H); 7,95-8,25 (*m*, 10 H, arom. H); 8,56 (*s*, 1 H, H-C(2)); 8,74 (2 *s*, 1 H, H-C(2)); 8,98 (*s*, 2 H, NH).

2.12. *Triäthylammonium-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'-JOP⁶-(2-[4-nitrophenyl]äthyl)]-5'-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin-3'-[2-(4-nitrophenyl)äthyl]phosphat (20)*. 4-Nitrobenzaldehydoxim (0,455 g, 2,73 mmol) wird in einer Mischung aus je 6 ml Et₃N, Dioxan und H₂O gelöst und nach 30minütigem Rühren bei RT. 0,500 g (0,273 mmol) **19** zugegeben. Nach 1 Std. Rühren ist chromatographisch keine Ausgangssubstanz mehr nachweisbar, und es wird dann sofort aufgearbeitet. Hierzu versetzt man die Reaktionslösung mit 5 ml Pyridin, engt i.V. ein und dampft anschliessend 3mal mit je 4 ml Pyridin sowie 3mal mit je 5 ml Benzol ein, um möglichst einen festen Rückstand zu erhalten. Zur Reinigung gibt man, in CHCl₃ gelöst, auf eine Kieselgelsäule (2,5×4 cm) und entwickelt zunächst mit einem Gradienten CHCl₃-CHCl₃/EtOH (95:5) gefolgt von einem weiteren linearen Gradienten bestehend aus CHCl₃/EtOH/Et₃N (90:5:5 - 60:20:20). Nach Einengen der gegen Ende eluierten Produktfraktion erhält man einen festen Rückstand, der in wenig CHCl₃ gelöst und unter Rühren in 30 ml Hexan/Et₂O (9:1) getropft wird. Man lässt noch einen Tag im Kühlschrank stehen, sammelt den Niederschlag und trocknet 2 Tage bei 50° i.V. über P₂O₅, wonach 0,447 g (92%) chromatographisch reiner, farbloser Feststoff gewonnen werden. UV (MeOH): max. 278 (4,77). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 1,23 (*t*, 9 H, HN⁺(CH₂CH₃)₃); 2,97 (*m*, 10 H, HN⁺(CH₂CH₃)₃, CH₂CH₂-C₆H₄-NO₂); 3,72 (*s*, 3 H, OCH₃); 6,04-6,07 (*m*, 2 H, H-C(1')); 8,18 und 8,28 (2 *s*, 2 H, H-C(2)); 8,62 und 8,74 (2 *s*, 2 H, H-C(8)).

2.13. *N⁶-Benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'-JOP⁶-(2-[4-nitrophenyl]äthyl)]-5'-N⁶-benzoyl-2',3'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin (21)*. a) Verbindung **18** (0,326 g, 0,300 mmol) [7] wird 3mal mit je 4 ml abs. Pyridin eingedampft. Man gibt 0,227 g (0,600 mmol) TPS-NI und etwas Pyridin zu, dampft erneut ein und gibt 0,18 g (0,30 mmol) **6** [8] zu, löst in 4 ml abs. Pyridin und rührt nach Einengen auf ca. 3 ml 20 Std. bei RT. Anschliessend werden nochmals 0,11 g (0,10 mmol) **18** und 0,76 mg (0,20 mmol) TPS-NI als Festsubstanzen zur Reaktionsmischung gegeben, und es wird weitere 24 Std. bei RT. gerührt. Man engt i.V. ein, dampft den Rückstand 5mal mit Benzol ein, löst den erhaltenen Schaum in wenig CHCl₃/Petrolether (7:3) und gibt auf eine 2,5-cm-Kieselgelsäule (50 g Kieselgel 60). Es wird zunächst mit CHCl₃/Petrolether (7:3) entwickelt, dann mit CHCl₃ und anschliessend mit einem Gradienten CHCl₃/MeOH (98:2). Durch Einengen der Hauptfraktion und Trocknen des Rückstandes i.V. gewinnt man 0,279 g (59%) farblosen Feststoff.

b) Verbindung **18** (0,544 g, 0,500 mmol) wird 3mal mit je 5 ml abs. Pyridin eingedampft, dann in 5 ml abs. Pyridin aufgenommen und 0,300 g (0,500 mmol) **6** sowie 0,38 g (1,0 mmol) TPS-NI zugegeben. Anschliessend wird 15 Std. bei RT. gerührt. Es wird wie voranstehend beschrieben aufgearbeitet, über eine 2,5-cm-Kieselgelsäule (75 g Kieselgel 60) chromatographiert und gereinigt. Nach Einengen der Hauptfraktion und Trocknen i.V. bei 50° gewinnt man 0,633 g (81%) farblosen Feststoff. UV (MeOH): max. 278 (4,71). ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 3,02 (*t*, 2 H, CH₂-C₆H₄-NO₂); 3,72

(s, 3 H, OCH₃); 6,0 (m, 2 H, H-C(1')); 6,77 (d, *J*=9, *o*-Anisyl-H); 7,1–7,65 (m, 20 H, aromat. H); 7,88–8,22 (m, 8 H, aromat. H); 8,67 (m, 2 H, H-C(2)); 10,07 (br. s, 2 H, NH).

C₈₀H₉₈N₁₁O₁₅PSi₃ (1569,0) Ber. C 61,24 H 6,30 N 9,82% Gef. C 61,44 H 6,16 N 9,70%

2.14. N⁶-Benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'-[OP-(2-[4-nitrophenyl]äthyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2',3'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin (**22**). In einer Lösung aus 0,2 ml Trifluoressigsäure und 20 ml trockenem CHCl₃ werden 0,633 g (0,400 mmol) **21** gelöst. Es wird 30 Min. bei RT. gerührt und dann die Reaktion durch Zugabe von 8 ml 0,1M TBK-Puffer pH 7,5 gestoppt. Nach Ausschütteln mit CHCl₃ wird die org. Phase mit Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird in CHCl₃ gelöst, auf eine 2,5-cm-Kieselgelsäule (75 g Kieselgel 60) gegeben und nacheinander mit 500 ml CHCl₃ und 500 ml eines Gradienten CHCl₃/MeOH (99:1–98:2) entwickelt. Die Hauptfraktion wird i.V. zum Schaum eingengt und der Rückstand nach Lösen in wenig CHCl₃ langsam unter Rühren in 60 ml Hexan getropft. Der abgeschiedene Niederschlag wird bei 60° i.V. getrocknet und liefert 0,457 g (88%) farblosen Feststoff. UV (MeOH): max. 278 (4,71). ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): = 3,05 (t, 2 H, CH₂-C₆H₄-NO₂); 5,74–5,97 (m, 3 H, H-C(1') und OH); 7,45–7,6 (m, 8 H, aromat. H); 7,92–8,22 (m, 8 H, aromat. H); 8,73 (m, 2 H, H-C(2)); 9,08 (m, 2 H, NH).

C₆₀H₈₂N₁₁O₁₄PSi₃ (1296,6) Ber. C 55,50 H 6,37 N 11,88% Gef. C 55,44 H 6,43 N 11,90%

2.15. N⁶-Benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'-[OP-(2-[4'-nitrophenyl]äthyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'-[OP-(2-[4'-nitrophenyl]äthyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'-[OP-(2-[4'-nitrophenyl]äthyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2',3'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin (**23**). Verbindung **20** (0,179 g, 0,100 mmol) wird mit 5 ml abs. Pyridin i.V. zur Trockne eingengt und dann 0,130 g (0,100 mmol) **22** zugegeben. Es wird noch 2mal mit je 4 ml abs. Pyridin i.V. eingedampft und der Rückstand in 5 ml abs. Pyridin gelöst. Dazu werden 80 mg (0,21 mmol) TPS-NT gegeben. Danach wird zum Sirup eingedampft. Man löst erneut in 3 ml abs. Pyridin, konzentriert auf 1,0 ml und rührt anschliessend 18 Std. bei RT. Nach beendeter Reaktion (ca. 18 Std.) wird mit 30 ml CHCl₃ verdünnt und erst mit 10 ml 0,1M TBK-Puffer pH 7,5, dann mit 10 ml H₂O ausgeschüttelt. Die CHCl₃-Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet, eingengt und der Rückstand 3mal mit wenig Benzol eingedampft. Das Rohprodukt wird in wenig CHCl₃ gelöst, auf eine 3-cm-Kieselgelsäule (60 g Kieselgel 60) gegeben und nacheinander mit 100 ml CHCl₃/Benzol (1:1), 100 ml CHCl₃/Benzol (3:1), 300 ml CHCl₃, 300 ml CHCl₃/MeOH (99:1) und 600 ml CHCl₃/MeOH (98:2) entwickelt. Die Hauptfraktion, die gegen Ende eluiert wird, fällt beim Einengen als fester Schaum an. Durch Behandlung mit Et₂O/Hexan und wenig CHCl₃ erhält man feine Kristalle. Nach Trocknen gewinnt man 0,217 g (73%) farbloses Produkt.

In einem zweiten Kondensations-Experiment wurde mit einem geringen Überschuss an **20** (0,257 g, 0,144 mmol) gegenüber **22** (0,156 mg, 0,12 mmol) gearbeitet und hierbei 0,282 g (79%) farblose Kristalle gewonnen. UV (MeOH): max. 278 (5,03). ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 3,01 (m, 6 H, CH₂-C₆H₄-NO₂); 3,70 (s, 3 H, OCH₃); 5,84–6,1 (m, 4 H, H-C(1')); 6,73 (d, *J*=9, 2 H, *o*-Anisyl-H); 7,15–7,55 (m, 30 H, aromat. H); 7,9–8,35 (m, 18 H, aromat. H); 8,54 (s, 1 H, H-C(2)); 8,71 (br. s, 3 H, H-C(2)); 9,05–9,2 (m, 4 H, NH).

C₁₄₂H₁₇₂N₂₃O₃₃P₈Si₅ (2952,4) Ber. C 57,57 H 5,85 N 10,87% Gef. C 57,28 H 5,85 N 10,74%

2.16. Adenosyl(3'-5')adenosyl(3'-5')adenosyl(3'-5')adenosin (**24**). Verbindung **23** (14,8 mg, 0,005 mmol) wird in 3 ml 0,5M DBU in Pyridin 20 Std. bei RT. gerührt. Man kühlt die Reaktionslösung mit Eiswasser und neutralisiert durch Zugabe von 1,5 ml 1M AcOH in Pyridin. Die neutrale Lösung wird im RV. eingengt und der Rückstand einmal mit Pyridin zur Trockne eindampft. Den erhaltenen Rückstand versetzt man mit 3 ml 0,5M Tetrabutylammoniumfluorid in Pyridin und rührt diese Lösung 2 Tage bei 23°. Es wird bidest. Wasser (3 ml) zugegeben und i.V. eingengt. Das gewonnene Öl wird in 5 ml H₂O aufgenommen, erneut eingedampft und dann zur Debenzoylierung mit 5 ml konz. NH₃ versetzt. Nach 2tägigem Rühren bei RT. wird eingengt, dann nochmals mit H₂O eingedampft und anschliessend zur Detritylierung in 5 ml 80proz. AcOH aufgenommen. Man rührt 20 Std. bei RT., engt ein und vertreibt die restliche AcOH durch mehrmaliges Eindampfen mit H₂O. Zur Reinigung des Rohprodukts wird auf eine mit 0,001M TBK-Puffer pH 7,5 äquilibrierte DEAE-Sephadex-A25-Säule (1×60 cm) gegeben und bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 20 Tropfen/Min. zunächst 30 Min. mit 0,001M TBK-Puffer entwickelt. Anschliessend chromatogra-

phiert man 16 Std. mit linearem, 0,001–0,5M, TBK-Puffer-Gradienten. Man fängt Fraktionen von je 250 Tropfen auf und erhält das Tetramere **25** aus den Fraktionen 54–62 mit 90proz. Ausbeute [UV-spektrometrisch ($\epsilon = 45000$) bestimmt]. Diese Substanz ist dünnschichtchromatographisch auf Cellulose sowie *PEI*-Cellulose einheitlich und bezüglich des R_f -Wertes identisch mit ApApApA der *Fa. Boehringer* (Mannheim).

Durch Einengen und mehrfaches Eindampfen mit H_2O i.V. gefolgt von Lyophilisieren der erhaltenen wässrigen Lösung wird **24** als Festsubstanz erhalten. 1H -NMR (250 MHz, D_2O): 5,55 (s, 2 H, H–C(1')); 5,66 und 5,72 (2 d, $J = 2,5$, 2 H, H–C(1')); 7,66, 7,69, 7,75, 7,84, 7,89, 7,95 und 8,01 (7 s, 8 H, H–C(2) und H–C(8)).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *R. Charubala, E. Uhlmann & W. Pfeleiderer*, Liebigs Ann. Chem. 1981, 2392.
- [2] *D. Flockerzi*, Dissertation, Univ. Konstanz 1980.
- [3] *E. Uhlmann*, Dissertation, Univ. Konstanz 1981.
- [4] *C. B. Reese*, Phosphorus Sulfur 1, 245 (1976).
- [5] *J. H. van Boom*, Heterocycles 7, 1197 (1977).
- [6] *C. B. Reese*, Tetrahedron 34, 3143 (1978).
- [7] *G. Silber, D. Flockerzi, R. S. Varma, R. Charubala, E. Uhlmann & B. Pfeleiderer*, Helv. Chim. Acta 64, 1704 (1981).
- [8] *D. Flockerzi, G. Silber, R. Charubala, W. Schlosser, R. S. Varma, F. Creegan & W. Pfeleiderer*, Liebigs Ann. Chem. 1981, 1568.
- [9] *J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, G. v. d. Marel, C. H. Verdegaal & G. Wille*, Nucleic Acids Res. 4, 1047 (1977).
- [10] *J. F. M. de Rooij, G. Wille-Hazeleger, P. H. v. Deursen, J. Serdjin & J. H. van Boom*, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 98, 537 (1979).
- [11] *C. B. Reese, R. C. Titmas & L. Yau*, Tetrahedron Lett. 1978, 2727.
- [12] *S. S. Jones, B. Rayner, C. B. Reese, A. Ubasawa & M. Ubasawa*, Tetrahedron 36, 3075 (1980).
- [13] *R. Charubala & W. Pfeleiderer*, Nucleic Acids Res., Symp. Ser. 1981, No. 9, 161.
- [14] *C. B. Reese & L. Zard*, Nucleic Acids Res. 9, 4611 (1981).
- [15] *E. Uhlmann & W. Pfeleiderer*, Helv. Chim. Acta 64, 1688 (1981).
- [16] *J. Brahms, A. M. Michelson & K. E. van Holde*, J. Mol. Biol. 15, 467 (1966).
- [17] Prof. Dr. *G. Helmchen*, Institut für Organische Chemie der Univ. Stuttgart, *D. Flockerzi*, Diplomarbeit, Univ. Stuttgart 1977.