

204. Nucleotide, XVIII¹⁾Synthese und Eigenschaften von (*tert*-Butyldimethylsilyl)guanosen,
Guanosin-3'-phosphotriestern und Guanosin-haltigen Oligonucleotiden²⁾

von Dieter Flockerzi, Wilhelm Schlosser und Wolfgang Pfeleiderer*

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

(22. VI. 83)

Nucleotides, XVIII. Synthesis and Properties of (*tert*-Butyldimethylsilyl)guanoses,
Guanosine-3'-Phosphotriesters and Guanosine-containing Oligonucleotides

Summary

Silylation of *N*²-benzoyl- (**1**) and *N*²-isobutyrylguanosin (**2**) by *tert*-butyldimethylsilyl chloride led to the various mono-, di- and tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl derivatives **3–15**. The synthesis of 2'- (**24–31**) and 3'-phosphotriesters (**16–23** and **32**) could be achieved by phosphorylations of partially protected guanosines. The guanosine-3'-phosphodiester **33** and the 5'-OH-guanosine-3'-phosphotriester **34** are used in condensation reactions as 5'- and 3'-terminal components, respectively, to form dinucleoside mono- (**39** and **40**) and diphosphates (**41–48**) in relatively good yields. The various products were characterized by elemental analyses, ¹H-, ¹³C-, and ³¹P-NMR spectra as well as UV and CD spectra.

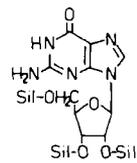
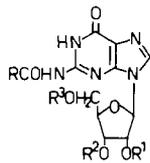
1. Einleitung. – Oligonucleotid-Synthesen mit Guanosin-Bausteinen wurden aufgrund experimenteller Schwierigkeiten bislang meist nur untergeordnet behandelt und sind unseres Wissens noch nicht systematisch untersucht worden. Die Probleme liegen dabei einmal in der bekannten relativen Schwerlöslichkeit des Guanosins und seiner Derivate begründet und treten zum andern auch durch eine erhöhte Imidazol-Reaktivität in Form einer Spaltung dieses Heteroringes und Bildung von fluoreszierenden Nebenprodukten in unerwünschtem Masse zutage.

2. Synthesen. – Wir begannen mit Phosphorylierungen der partiell *tert*-Butyldimethylsilyl-geschützten *N*²-Acylguanosine **4**, **5**, **11** und **12**, die analog den Befunden beim *N*⁴-Benzoyl-cytidin [4] oder nach den Angaben von Ogilvie [5–11] durch Silylierungen des *N*²-Benzoyl- (**1**) und *N*²-Isobutyrylguanosins (**2**) mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMSCl)/Imidazol (IM) in DMF synthetisiert wurden. Bei Anwendung eines Verhältnisses TBDMSCl/IM wie 1:2 im 4fach äquivalenten Überschuss zum *N*²-Acylguanosin **1** und **2** führt die Umsetzung bei tiefen Temp. (2–3 °C) überwiegend zu einer Monosubstitution in 5'-Stellung und ergibt das

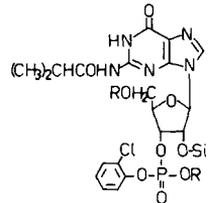
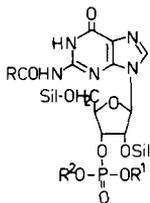
¹⁾ Teil XVII: [1].

²⁾ Aus den Dissertationen von D. F. [2] und W. S. [3].

*N*²-Benzoyl-5'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)guanosin (**3**) in 73proz. bzw. das entsprechende *N*²-Isobutyryl-Derivat **10** in 61proz. Ausbeute. Der gleiche Reaktionsansatz führt bei 25–30 °C jeweils zu einem Gemisch bestehend aus drei Verbindungen, von denen als Hauptprodukte die beiden Isomeren *N*²-Acyl-2',5'- (**4** und **11**) und *N*²-Acyl-3',5'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)guanosine (**5** und **12**) neben wenig der entsprechenden 2',3',5'-Tris-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-Derivate (**6** und **13**) identifiziert wurden. Ihre Trennung und Isolierung gelingt durch kombinierte fraktionierende Kristallisation und Schichtchromatographie: **4** (37%) und **5** (35%) bzw. **11** (29%) und **12** (19%). Durch 8fachen Überschuss an Silylierungsmittel und verlängerte Reaktionszeit kommt es zu einer vollständigen Substitution im Zucker- teil der Nucleoside unter Bildung des *N*²-Benzoyl- (**6**) mit 95- und des *N*²-Isobutyryl- 2',3',5'-tris-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)guanosins (**13**) mit 55proz. Ausbeute.



R	R ¹	R ²	R ³	R	R ¹	R ²	R ³
1	C ₆ H ₅	H	H	8	C ₆ H ₅	H	Sil
2	CH(CH ₃) ₂	H	H	9	C ₆ H ₅	Sil	Sil
3	C ₆ H ₅	H	H	10	CH(CH ₃) ₂	H	H
4	C ₆ H ₅	Sil	H	11	CH(CH ₃) ₂	Sil	H
5	C ₆ H ₅	H	Sil	12	CH(CH ₃) ₂	H	Sil
6	C ₆ H ₅	Sil	Sil	13	CH(CH ₃) ₂	Sil	Sil
7	C ₆ H ₅	Sil	H	14	CH(CH ₃) ₂	Sil	H



R	R ¹	R ²	R	R ¹
16	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	24	CH ₂ CH ₂ CN
17	C ₆ H ₅	<i>o</i> -Cl-C ₆ H ₄	25	HNEt ₃
18	CH(CH ₃) ₂	C ₆ H ₅	26	CH ₂ CH ₂ CN
19	CH(CH ₃) ₂	<i>o</i> -Cl-C ₆ H ₄	27	
20	C ₆ H ₅	<i>o</i> -Cl-C ₆ H ₄	28	
21	CH(CH ₃) ₂	<i>o</i> -Cl-C ₆ H ₄	29	
22	C ₆ H ₅	<i>o</i> -Cl-C ₆ H ₄	30	
23	CH(CH ₃) ₂	<i>o</i> -Cl-C ₆ H ₄	31	

Eine interessante Variante ist die selektive Abspaltung des 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-Restes, was in AcOH/H₂O (8:1) bei 50 °C recht gut gelingt. Dies führt aus **4** und **5** zu *N*²-Benzoyl-2'-*O*- (**7**) bzw. *N*²-Benzoyl-3'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)guanosin (**8**) sowie aus **6** und **13** zu *N*²-Benzoyl-2',3'-bis-*O*- (**9**) bzw. *N*²-Isobutyryl-2',3'-bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)guanosin (**14**). Darüber hinaus haben

Tabelle 1. ¹H-Breitband-entkoppelte PFT-¹³C-NMR-Spektren silylierter N²-Acyguanosine in (D₆)DMSO (δ-Werte)

Verbindung	Substituenten ^{a)} an			Zucker-C-Atome				Silylgruppen-C-Atome				CH ₃ -Si-CH ₃
	2'-O	3'-O	5'-O	C(1')	C(4')	C(2')	C(3')	C(5')	(CH ₃) ₃	Si-C		
1	H	H	H	86,4	85,3	73,8	70,2	61,1	-	-	-	-
3	H	H	TBDMS	86,6	84,4	73,7	69,8	62,9	25,6	17,8	-	-5,6
4	TBDMS	H	TBDMS	85,9	85,4	76,1	70,3	63,1	25,6, 25,3	17,8, 17,5	-	-5,1, -5,5, -5,6
5	H	TBDMS	TBDMS	85,8	85,5	72,5	72,4	62,7	25,6	17,8, 17,7	-	-4,6, -5,2, -5,7
6	TBDMS	TBDMS	TBDMS	86,0	85,8	75,0	72,8	62,8	25,6, 25,5, 25,2	17,8, 17,6, 17,3	-	-4,8, -4,9, -5,0, -5,7
7	TBDMS	H	H	86,0	85,9	75,8	70,5	61,2	25,3	17,5	-	-5,1, -5,5
8	H	TBDMS	H	86,4	85,8	73,1	72,7	61,1	25,6	17,9	-	-3,5, -5,1
9	TBDMS	TBDMS	H	87,0	85,8	75,3	73,1	61,1	25,7, 25,3	17,6, 17,3	-	-4,8, -4,9, -5,7
2	H	H	H	86,6	85,2	73,8	70,1	61,1	-	-	-	-
10	H	H	TBDMS	86,6	85,8	73,7	70,1	62,7	25,6	17,8	-	-5,5, -5,6
11	TBDMS	H	TBDMS	85,9	85,5	76,3	70,3	63,1	25,6, 25,2	17,8, 17,5	-	-5,1, -5,6
12	H	TBDMS	TBDMS	85,7	85,4	72,7	72,2	62,6	25,6, 25,2	17,7	-	-4,7, -5,3, -5,7
13	TBDMS	TBDMS	TBDMS	86,2	85,4	75,5	72,8	62,9	25,6, 25,5, 25,2	17,8, 17,6, 17,2	-	-4,8, -4,9, -5,0, -5,7, -5,81
14	TBDMS	TBDMS	H	87,0	85,5	75,6	73,1	61,1	25,6, 25,2	17,6, 17,3	-	-4,8, -4,9, -5,8
15 ^{b)}	TBDMS	TBDMS	TBDMS	86,5	85,3	74,9	72,5	62,7	25,6, 25,5, 25,2	17,8, 17,6, 17,5	-	-4,9, -5,01, -5,6 -5,7

a) TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl. b) Deacyliert an N²-Atom.

Tabelle 2. UV- und ¹H-NMR-Spektren

Verbindung	UV-Absorptionswerte (MeOH)								Substituent ^{a)} an		
	λ_{max} [nm]				lg ϵ				2'-O	3'-O	5'-O
1	236	258	264	294	4,21	4,16	4,16	4,17	H	H	H
3	236	257	264	293	4,19	4,15	4,15	4,14	H	H	TBDMS
4	234	257	264	293	4,24	4,19	4,19	4,19	TBDMS	H	TBDMS
5	236	258	264	294	4,24	4,19	4,19	4,19	H	TBDMS	TBDMS
6	234	257	264	293	4,23	4,19	4,19	4,19	TBDMS	TBDMS	TBDMS
7	236	257	264	294	4,18	4,13	4,13	4,13	TBDMS	H	H
8	236	257	264	298	4,18	4,13	4,13	4,13	H	TBDMS	H
9	234	257	263	293	4,24	4,19	4,19	4,19	TBDMS	TBDMS	H
2		255	259	280		4,23	4,23	4,10	H	H	H
10		255	259	280		4,22	4,22	4,08	H	H	TBDMS
11		255	259	277		4,21	4,21	4,08	TBDMS	H	TBDMS
12		255	259	277		4,22	4,22	4,08	H	TBDMS	TBDMS
13		255	258	277		4,23	4,23	4,10	TBDMS	TBDMS	TBDMS
14		256	260	279		4,21	4,21	4,08	TBDMS	TBDMS	H
15 ^{d)}		254		[272]		4,19		3,94 ^{e)}	TBDMS	TBDMS	TBDMS

^{a)} TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl. ^{b)} *d* = Dublett, *br. d* = breites Dublett, *pt* = Pseudotriplett. ^{c)} Anzahl der Protonen in Klammern. ^{d)} Deacyliert an *N*²-Atom. ^{e)} Schulter.

wir in **6** und **13** mit Et₃N in MeOH auch die *N*²-Acyl-Gruppen abgespalten und in hohen Ausbeuten das 2',3',5'-Tris-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)guanosin (**15**) erhalten.

Zur Strukturzuordnung speziell der isomeren Disilyl-Derivate **4** und **5** sowie **11** und **12** wurden analog zu früheren Untersuchungen in der Cytidin-Reihe [4] die ¹³C-NMR-Spektren herangezogen, die sich bei Einführung einer *tert*-Butyldimethylsilyl-Gruppe durch eine jeweilige Tieffeldverschiebung von 1,2–3,0 ppm des benachbarten alkoholischen Ring-C-Atoms im Vergleich zum *N*²-Acylguanosin auszeichnen (Tab. 1).

Zur weiteren Charakterisierung der Guanosine **1–15** dienten UV- und ¹H-NMR-Spektren (Tab. 2) sowie CHN-Analysen.

Die Phosphorylierungen an den partiell blockierten Guanosinen **4**, **5**, **11** und **12** haben wir zunächst mit Diphenylchloridphosphat und Bis(*o*-chlorphenyl)chloridphosphat untersucht. Die Reaktionen wurden in CH₃CN/Pyridin-Lösung unter der Katalyse von 1-Methylimidazol [12] durchgeführt und lieferten zwischen 40 und 70% wechselnde Ausbeuten, bedingt in erster Linie durch präparative Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches und Reinigung der Reaktionsprodukte **16–19** und **24–27**. Die gemischten Phosphotriester **20–23** und **28–31** wurden einmal analog durch Reaktion mit (*o*-Chlorphenyl)(2,2,2-trichloräthyl)chloridphosphat [13] und zum andern durch stufenweise Veresterung des (*o*-Chlorphenyl)dichloridphosphats erstens mit den 2'- und 3'-OH-Guanosin-Derivaten und zweitens mit β -Hydroxypropionitril unter der katalytischen Wirkung von

von silylierten N²-Acylguanosenen

¹ H-NMR ((D ₆)DMSO (δ-Werte, J (Hz)) ^b)					Silyl-Gruppen ^c)		
H-C(1')	J(1',2')	2'-OH	3'-OH	5'-OH	(CH ₃) ₂ Si	[(CH ₃) ₃ C]Si	
5,88 (<i>d</i>)	6,0	5,42 (br. <i>d</i>)	5,12 (br. <i>d</i>)	5,00 (<i>pt</i>)	-	-	
5,88 (<i>d</i>)	5,0	5,48 (br. <i>d</i>)	5,12 (br. <i>d</i>)	-	0,06 (6)	0,82 (9)	
5,94 (<i>d</i>)	8,0	-	5,10 (br. <i>d</i>)	-	0,12 (6)	-0,02 (3)	0,94 (9) 0,84 (9)
						-0,12 (3)	
5,86 (<i>d</i>)	6,5	5,44 (br. <i>d</i>)	-	-	0,12 (6)	0,10 (6)	0,9 (9) 0,88 (9)
5,90 (<i>d</i>)	8,0	-	-	-	0,10 (12)	-0,08 (3)	0,9 (18) 0,72 (9)
						-0,30 (3)	
5,88 (<i>d</i>)	6,0	-	5,08 (br. <i>d</i>)	5,08 (<i>pt</i>)	-0,02 (3)	-0,16 (3)	0,7 (9)
5,86 (<i>d</i>)	6,5	5,34 (br. <i>d</i>)	-	5,04 (<i>pt</i>)	0,14 (6)		0,9 (9)
5,92 (<i>d</i>)	8,0	-	-	5,16 (<i>pt</i>)	0,12 (3)	0,10 (3)	0,9 (9) 0,88 (9)
5,81 (<i>d</i>)	6,0	5,45 (br. <i>d</i>)	5,16 (br. <i>d</i>)	5,03 (<i>pt</i>)	-		-
5,94 (<i>d</i>)	5,0	5,60 (br. <i>d</i>)	5,24 (br. <i>d</i>)	-	0,06 (6)		0,9 (9)
5,88 (<i>d</i>)	6,0	-	5,08 (br. <i>d</i>)	-	0,08 (6)	-0,04 (3)	0,9 (9) 0,7 (9)
						-0,2 (3)	
5,76 (<i>d</i>)	7,0	5,40 (br. <i>d</i>)	-	-	0,14 (6)	0,08 (6)	0,9 (18)
5,86 (<i>d</i>)	6,0	-	-	-	0,10 (12)	-0,06 (3)	0,9 (18) 0,88 (9)
						-0,3 (3)	
5,82 (<i>d</i>)	6,0	-	-	5,16 (<i>pt</i>)	0,12 (6)	-0,08 (3)	0,9 (9) 0,7 (9)
						-0,32 (3)	
5,72 (<i>d</i>)	4,0	-	-	-	0,1 (12)	-0,06 (3)	0,9 (18) 0,7 (9)
						-0,24 (3)	

1,2,4-Triazol dargestellt. Die Charakterisierung der vollgeschützten Guanosinphosphotriester **16-31** erfolgte durch CHN-Analysen sowie UV-, ¹H-NMR- und ³¹P-NMR-Spektren (Tab. 3).

Bei den ¹H-NMR-Spektren sind vor allem die Signale der anomeren Protonen H-C(1') typisch, die erwartungsgemäss als *d* mit Kopplungskonstanten von 4-5 Hz erscheinen. Die Anomeren-Protonen der Guanosin-2'-phosphotriester absorbieren dabei vergleichsweise bei tieferem Feld als die der 3'-Isomeren, und die chiralen Vertreter **28**, **29** und **31** lassen an der weiteren Aufspaltung in zwei *d* sogar die beiden Diastereomeren erkennen. Darüber hinaus werden die P-O-CH-Protonen durch die Phosphotriester-Reste verstärkt entschirmt, wodurch sich ihre Signale von denen der übrigen Zuckerprotonen durch eine Tieffeldverschiebung in den Bereich δ = 5,5-6,2 unterscheiden.

Die ³¹P-NMR-Spektren in CDCl₃ zeigen bei den chiralen Guanosinphosphotriestern **20-23** und **28-31** jeweils zwei Signale, aus denen sich das Diastereomerenverhältnis leicht ermitteln lässt. Auffallend ist bei den ³¹P-Signalen ferner, dass der Austausch eines Aryl-Restes an der Phosphat-Funktion gegen einen aliphatischen Rest zu einer Hochfeldverschiebung führt und dass die Verknüpfung mit der 2'-Position im Vergleich zur 3'-Stellung generell eine Absorption bei tieferem Feld zur Folge hat.

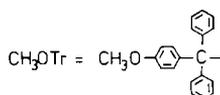
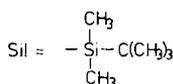
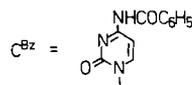
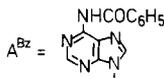
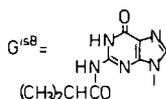
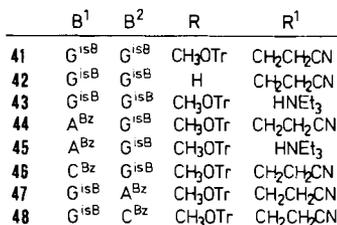
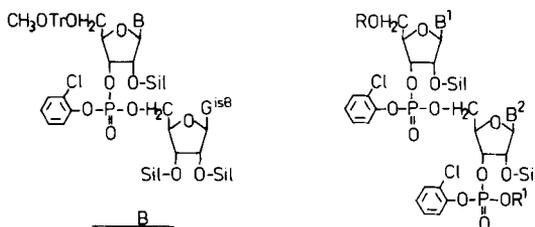
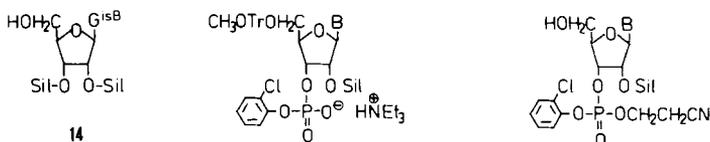
Nach zunächst erfolglosen Versuchen, die neu dargestellten Guanosinphosphotriester durch Hydrolyse zu den entsprechenden Phosphodiestern als Komponenten für den Aufbau von Oligonucleotiden zu verwenden, bot sich dann als günstigere Variante die in der Adenosin-Reihe erfolgreich praktizierte Strategie [1] an. Hierzu wird ausgehend vom 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-N²-isobutyryl-5'-O-(4-methoxytrityl)guanosen-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat [14] (**32**) durch Triäthylamin-Behandlung einmal das Triäthylammonium-Salz des entsprechenden Phosphodiesters **33** und zum andern durch Säurebehandlung unter Detritylierung der

Tabelle 3. UV- (MeOH) sowie ¹H- und ³¹P-NMR-Spektren (CDCl₃; δ-Werte, J in Hz) von vollgeschützten Guanosinphosphotriestern

Verbindung	UV-Absorptionswerte ^{a)}								¹ H-NMR ^{b)}			³¹ P-NMR ^{c)}
	λ _{max} (nm)				lg ε				H-C(1')	J(1',2')	P-O-CH	
16	237	257	261	292	4,20	4,18	4,18	4,16	5,80 (d)	4,0	6,28	10,35
17	237	258	259	292	4,17	4,19	4,17	4,14	5,88 (d)	4,0	6,12	11,85
18		257		277				4,24	5,80 (d)	4,0	6,12	11,62
19	[255]	260	272	[282]	[4,24]	4,25	4,12	[4,10]	5,90 (d)	4,0	5,86	12,73
20	237	258	263	292	4,19	4,18	4,18	4,16	5,92 (d)	5,0	5,70	8,13 (10) 7,56 (7)
21		257	271	[283]		4,23	4,10	[4,08]	5,80 (d)	5,0	5,70	8,65 (10) 8,05 (2)
22	236	256	264	292	4,21	4,20	4,20	4,18	5,92 (d)	5,0	5,80	7,49 (9) 7,21 (10)
23		257	271	[282]		4,15	4,01	[3,99]	5,90 (d)	5,0	5,56	8,29 (7) 7,75 (10)
24	237	253		290	4,15	4,11		4,08	6,22 (d)	5,0	5,60	13,05
25	237	260		290	4,15	4,11		4,08	6,30 (d)	5,0	5,74	13,76
26	[255]	259		277	[4,20]	4,21		4,08	6,14 (d)	5,0	5,50	13,38
27		260	272	[283]		4,25	4,12	[4,11]	6,22 (d)	5,0	5,64	13,95
28	235	255	262	290	4,18	4,12	4,10	4,09	6,26 (d)	5,0	5,60	9,69 (1) 8,99 (1)
29		258		277		4,18		4,05	6,22 (d)	5,0	5,50	9,66 (10) 9,17 (7)
30	235	260		292	4,18	4,14		4,13	6,60 (d)	5,0	5,70	9,12 (3) 8,05 (20)
31		257	271	[282]		4,11	3,99	[3,95]	6,16 (d)	5,0	5,52	9,21 (10) 8,50 (4)

a) Schulter in eckigen Klammern. b) d = Dublett. c) Integrationsverhältnis in runden Klammern.

5'-OH-Guanosinphosphotriester **34** hergestellt. Für das 3'-Ende der Oligonucleotid-Kette wird das 2', 3'-Bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)*N*²-(isobutyryl)guanosin (**14**) eingesetzt, das man aber nicht wie hier beschrieben aus **13** sondern besser aus dem entsprechenden 5'-*O*-(4-Methoxytrityl)-Derivat [15] durch Säurespaltung gewinnt. Ausgehend vom Guanosinphosphodiester **33** wurden zunächst die Kondensationen mit den 5'-OH-Komponenten **14** und **34** zu den Dimeren GpG (**39**) bzw. GpGp (**41**) untersucht. Mit 2, 4, 6-Triisopropylbenzylsulfonsäure-(4-nitroimidazolid) (TPS-NI) als Kondensationsmittel bildete sich **39** in nur 30proz. Ausbeute, und mit dem reaktiveren Mesitylensulfonsäure-(4-nitroimidazolid) (MS-NI) wurde die Ausbeute dann auf 42% gesteigert. Stets wurden hierbei aber erhebliche Detritylierungen sowie die Bildung polarer, rötlicher bis brauner Zersetzungsprodukte beobachtet. Mit 2, 4, 6-Triisopropylbenzylsulfonsäure-(3-nitro-1, 2, 4-triazolid) (TPS-NT) [6] schliesslich gelang es durch Variation der Kondensationsbedingungen die Ausbeuten sukzessive zu steigern, so dass bei 0–5° und 24stündiger Reaktionszeit 74% an **39** resultierten. Auch die Synthese des Dimeren **41** wurde optimiert, wobei das Molverhältnis der Reaktionskomponenten und des Kondensationsmittels TPS-NT zueinander sowie eine relativ tiefe Reaktionstemp. von +5 °C als entscheidend für eine gute Ausbeute (87%) erkannt wurde.



Die Detritylierung von **41** mit *p*-Toluolsulfonsäure in CH₂Cl₂/MeOH verlief problemlos mit 96proz. Ausbeute zu **42** und durch die basenkatalysierte Eliminierung der Cyanäthyl-Gruppe liess sich der entsprechende terminale 3'-Phosphodiester **43** ebenfalls mit 95% gewinnen.

Der nächste Problemkreis beschäftigt sich dann mit der Synthese gemischter Guanosin-haltiger Dinucleosidmonophosphotriester und Dinucleosid-bis(phosphotriester) nach demselben Aufbauprinzip der Kondensation eines Phosphodiesters mit der 5'-OH-Komponente. Triethylammonium-[*N*⁶-benzoyl-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-*O*-(4-methoxytrityl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] (**35**) wurde mit **14** in Gegenwart von MS-NI als Kondensationsmittel umgesetzt und **40** ohne Optimierung der Reaktionsbedingungen mit 60proz. Ausbeute isoliert. Das sehr ähnliche chromatographische Verhalten von nicht umgesetztem Nucleosid **14**

und dem dimeren Reaktionsprodukt gestaltete die Isolierung und Reinigung von **40** schwierig und erklärt dadurch auch die nicht ganz befriedigende Ausbeute. Die Darstellung von **44** wurde etwas gründlicher bearbeitet, wobei sich zeigte, dass die Kondensationsreaktion zwischen **35** und **34** recht empfindlich gegenüber Variationen der Reaktionsbedingungen ist. Am günstigsten erwies sich bei Verwendung von TPS-NI eine 12stündige Reaktionszeit bei 0 °C, wobei sich **45** mit 60proz. Ausbeute gewinnen liess. Das Auftreten von farbigen Nebenprodukten polaren Charakters verrät eine gewisse Labilität der endständigen 3'-(2-Chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat-Gruppe speziell am Guanosin-Baustein. Die Abspaltung der Cyanäthyl-Gruppe in **44** mit Et₃N verlief erwartungsgemäss mit hoher Ausbeute (92%) zu **45**.

Die Synthese des vollgeschützten CpGp (**46**) aus **36** und **34** ergab keine neuen Gesichtspunkte und konnte mit MS-NI als Kondensationsmittel und einer relativ langen Reaktionszeit von 66 Stunden mit 52proz. Ausbeute realisiert werden.

Aus den entsprechenden Umsetzungen zu den Dinucleosid-bis(phosphotriestern) **47** und **48** mit einer Guanosin-Einheit am 5'-Ende konnten, nach dem Reaktionsverlauf zu schliessen, bislang noch keine allgemein gültigen und verwertbaren Gesichtspunkte abgeleitet werden, denn **33** reagiert mit **38** nach Optimierung der Bedingungen mit maximal 54proz. Ausbeute zu **48**, während die analoge Reaktion mit **37** schon im ersten Versuch 90% **47** ergab.

3. Physikalische Daten. — Die Charakterisierung der Guanosin-haltigen Dimeren erfolgte durch CHN-Analysen sowie UV- und CD-Spektren (*Tab. 4*).

In den UV-Absorptionsspektren kommt die Gegenwart des Guanosin-Chromophors in der Dreibandigkeit der Spektren im Bereich 255–280 nm zum Ausdruck und lediglich die Kombination mit dem N⁴-Benzoylcytidin-Baustein wirkt sich in einer längerwelligen Absorption knapp über 300 nm aus. Erstaunlich gut ist die spektrale Übereinstimmung strukturanaloger Verbindungen wie **39**, **41**, **42** und **43** oder **44**, **45** und **47** bzw. **46** und **48**. Die sequenziell gegenläufigen Kombinationen ApGp (**44**) und GpAp (**47**) bzw. CpGp (**46**) und GpCp (**48**) sind in ihrem spektralen Verhalten so ähnlich, was wohl mit einer gestreckten Konformation ohne nennenswerte intramolekulare Wechselwirkung im Sinne eines «Stacking»-Effektes interpretiert werden kann.

In gleicher Weise können auch die CD-Spektren gedeutet werden, denn auch hier kommt die strukturelle Verwandtschaft etwa von **39**, **41**, **42** und **43** bzw. **40** und **44** sowie **46** und **48** in ähnlichen Kurverläufen zum Ausdruck. Lediglich **45** fällt aus der Reihe, das ein nahezu spiegelbildliches CD-Verhalten zu **40** und **44** zeigt. Möglicherweise zwingt hier die endständige polare 3'-Phosphodiester-Funktion dem Molekül eine andersartige starre Konformation auf, die in einer Wechselwirkung des ionischen Phosphat-Restes mit dem Elektronen-defizienten Pyrimidin-Teil der Adenin-Base bestehen könnte. Die komplexen Verhältnisse können aber ohne Frage erst durch weitere strukturell verwandte Beispiele und vertiefte Studien über die Feinstrukturen dieser Verbindungstypen eine befriedigende Erklärung finden.

Wir danken der *Studienstiftung des Deutschen Volkes* für ein Stipendium (*D. Flockerzi*), dem *Fonds der Chemischen Industrie* für finanzielle Hilfe und Frau *M. Bischler* für die Aufnahme der UV- und CD-Spektren sowie Herrn *E. Krientz* für die NMR-Messungen.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert. Das Einengen und Eindampfen von Reaktions- und Extraktionslösungen wird stets im Büchi-Rotationsverdampfer vorgenommen. Der verwendete Petroläther hatte den Siedebereich 50–70°. Dünnschichtchromatographie: Dünnschichtfolien Cellulose F 1440 LS 254 und Kieselgel F 1550 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 [15] und Kieselgel LiChroPrep Si 60 (15–25 µ) für die präp. Fertigsäulen vom Typ 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 1977 [17] 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. 115/60, der Fa. Applied Physics. NMR-Spektren: Bruker-Geräte HFX-90 und WM-250 sowie Jeol-Gerät JNM-MH-100. Abkürzungen: TBDMSCl = *tert*-Butyldimethylsilylchlorid, DMF = Dimethylformamid, TPS-NT = 2,4,6-Trisopropylbenzolsulfonsäure-(3-nitro-1,2,4-triazolid), MS-N1 = Mesitylsulfonsäure-(4-nitroimidazolid), GFS-Kieselgelsäule = «Great-flow-system»-Säule.

2.1. *N*²-Benzoyl-5'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)guanosin (3). *N*²-Benzoylguanosin (1; 0,194 g, 0,500 mmol) wird mit 0,295 g (4,40 mmol) Imidazol in 7,5 ml abs. DMF gelöst. Unter Rühren bei 2–3° wird eine Lösung von 0,332 g (2,20 mmol) TBDMSCl in 1,5 ml abs. DMF während 5 Min. zugetropft. Man lässt 1,5 Std. bei derselben Temp. reagieren und tropft dann die Reaktionslösung langsam in 70 ml Eis/H₂O ein. Der Niederschlag ergibt nach Trocknen bei 50° 0,185 g (73%). Zur Reinigung wird in wenig MeOH gelöst, mit der 10fachen Menge Et₂O verdünnt und im Kühlschrank längere Zeit aufbewahrt, wobei sich 0,152 g (60%) farblose Kristalle mit Schmp. 189–192° abscheiden.

C₂₃H₃₁N₅O₆Si (501,6) Ber. C 55,07 H 6,23 N 13,96% Gef. C 54,96 H 6,45 N 13,88%

2.2. *N*²-Benzoyl-2',5'-bis-O- und *N*²-Benzoyl-3',5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)guanosin (4 bzw. 5). Verbindung 1 (3,87 g, 10,0 mmol) wird mit 5,91 g (88,0 mmol) Imidazol in 40 ml abs. DMF gelöst und bei 25–30° unter Rühren mit einer Lösung von 6,6 g (44,0 mmol) TBDMSCl in 20 ml DMF tropfenweise versetzt. Nach 1 Std. wird die Reaktionslösung in 0,5 l Eis/H₂O unter Rühren eingetropft, wobei zunächst ein flockiger, später klebrig werdender Niederschlag ausfällt. Man filtriert ab, löst mit Dioxan vom Filter und entfernt das Lösungsmittel i.V. Der erhaltene Rückstand wird 15 Min. mit 50 ml Et₂O unter Rückfluss gekocht, und es wird noch warm vom Ungelösten abfiltriert. Der Rückstand (2,1 g) besteht aus chromatographisch reinem 4. Aus dem Et₂O-Filtrat kristallisieren beim Abkühlen 2,0 g 5 aus, die mit 3 ml MeOH gewaschen und dann getrocknet werden. Die vereinigten Filtrate werden anschliessend zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird nach Lösen in wenig CHCl₃ auf 3 präp. Kieselgelplatten (40 × 20 × 0,2 cm) aufgetragen und mit Et₂O/Petroläther (9:1) entwickelt. Es tritt Auftrennung in 4 Zonen ein, die mit CHCl₃/EtOH (2:1) eluiert werden, wobei man nach steigendem R_F-Wert 0,1 g 3, 0,14 g 5, 0,2 g 4 und 0,3 g 6 gewinnt; 4 bildet feine Nadeln, wenn es mit wenig MeOH versetzt und durch Zugabe von Et₂O zur Kristallisation gebracht wird. Man gewinnt 2,3 g (37%) 4 mit Schmp. 225°.

C₂₉H₄₅N₅O₆Si₂ (615,9) Ber. C 56,56 H 7,36 N 11,37% Gef. C 56,45 H 7,50 N 11,38%

Aus den 2,14 g (35%) 5 erhält man durch Umkristallisation aus MeOH analysenreines Produkt, das ab 130° erweicht und von 216° bis 222° schmilzt.

C₂₉H₄₅N₅O₆Si₂ (615,9) Ber. C 56,56 H 7,36 N 11,37% Gef. C 56,66 H 7,48 N 11,40%

2.3. *N*²-Benzoyl-2',3',5'-tris-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)guanosin (6). Verbindung 1 (1,90 g, 4,90 mmol) wird in 60 ml DMF gelöst und nacheinander unter Rühren 5,80 g (86,5 mmol) Imidazol und 6,5 g (43 mmol) TBDMSCl zugegeben. Man rührt 48 Std. bei RT., tropft unter Rühren in Eis/H₂O und saugt den ausgeschiedenen Niederschlag ab. Das Produkt wird dann mit 20 ml MeOH unter Rückfluss gekocht. Beim Abkühlen scheiden sich 3,39 g (95%) farblose Kristalle mit Schmp. 120°–130° ab.

C₃₅H₅₉N₅O₆Si₃ (730,2) Ber. C 57,58 H 8,15 N 9,59% Gef. C 57,92 H 8,05 N 9,62%

2.4. *N*²-Benzoyl-2'-O-(tert-butyl dimethylsilyl)guanosin (7). Verbindung 4 (1,24 g, 2,0 mmol) wird in einer Mischung aus 40 ml AcOH und 5 ml H₂O 20 Std. auf 50° erwärmt. Man tropft die Reaktionslösung anschliessend in 400 ml Eis/H₂O und stumpft mit festem K₂CO₃ auf pH 5 ab. Der erhaltene Niederschlag wird durch Lösen in wenig AcOEt und Eintropfen in Pentan umgefällt, wobei 0,552 g (55%) farblose Festsubstanz anfällt. Durch Umkristallisation aus Äthylmethylketon/CHCl₃ (2:1) erhält man 0,31 g (31%) farblose Kristalle, die zwischen 135° und 165° sintern.

C₂₃H₃₁N₅O₆Si (501,6) Ber. C 55,07 H 6,23 N 13,96% Gef. C 55,34 H 6,62 N 13,61%

2.5. *N*²-Benzoyl-3'-O-(tert-butyl dimethylsilyl)guanosin (8). Verbindung 5 (1,24 g, 2,0 mmol) wird für 7 beschrieben 72 Std. auf 50° erwärmt und aufgearbeitet. Da das Rohprodukt (0,8 g) chromatographisch nicht einheitlich ist, wird es nach Lösen in wenig CHCl₃/MeOH (1:1) auf 4 präp. Kieselgelplatten (40×20×0,2 cm) aufgetragen und mit Äthylmethylketon/CHCl₃ (2:1) entwickelt. Das Hauptprodukt mit dem niedrigsten R_F-Wert von 0,6 wird mit CHCl₃/EtOH (2:1) eluiert, das Eluat eingengt und der Rückstand nach Lösen in wenig MeOH durch langsames Zutropfen von H₂O zur Kristallisation gebracht, wobei sich 0,75 g (75%) farblose Kristalle mit Schmp. 140–165° (Sintern) abscheiden.

C₂₃H₃₁N₅O₆Si (501,6) Ber. C 55,07 H 6,23 N 13,96% Gef. C 54,90 H 6,36 N 13,65%

2.6. *N*⁶-Benzoyl-2', 3'-bis-O-(tert-butyl dimethylsilyl)guanosin (9). Verbindung 6 (3,0 g, 4,1 mmol) wird in einer Mischung aus 93 ml AcOH und 12 ml H₂O 50 Std. bei 50° gerührt. Anschliessend giesst man langsam unter starkem Rühren in 1 l Eis/H₂O, filtriert den abgeschiedenen Niederschlag und trocknet im Vakuumexsikkator. Das Rohprodukt wird nach Lösen in wenig Äthylmethylketon auf 10 präp. Kieselgelplatten (40×20×0,2 cm) aufgegeben und mit CHCl₃/Äthylmethylketon (1:2) entwickelt. Das breite Band mit R_F=0,6–0,7 wird abgekratzt, mit CHCl₃/EtOH (2:1) eluiert, eingengt und liefert nach Trocknen 1,95 g (77%) chromatographisch reines 9. Kristalle können erhalten werden, wenn man in MeOH löst, mit H₂O verdünnt und dann anreibt. Das kristalline 9 schmilzt bei 215–220°.

C₂₉H₄₅N₅O₆Si₂ (615,9) Ber. C 56,56 H 7,36 N 11,37% Gef. C 56,56 H 7,32 N 11,38%

2.7. 5'-O-(tert-Butyl dimethylsilyl)-*N*²-isobutyrylguanosin (10). In 14 ml DMF werden 0,59 g (8,8 mmol) Imidazol und 0,353 g (1,00 mmol) *N*²-Isobutyrylguanosin (2) gelöst. Dann wird bei RT. während 5 Min. eine Lösung von 0,66 g (4,4 mmol) TBDMSCl in 6 ml abs. DMF unter Rühren zugegropft. Nach 10min. Rühren wird die Reaktionslösung in 200 ml Eis/H₂O getropft und das abgeschiedene Produkt im Vakuumexsikkator getrocknet. Man löst das Rohprodukt in 4 ml CHCl₃/MeOH (1:1), trägt auf 2 präp. Kieselgelplatten (40×20×0,2 cm) auf und entwickelt mit Äthylmethylketon/CHCl₃ (2:1), wobei Auftrennung in drei Zonen erfolgt. Das kurzlaufende Hauptband mit R_F=0,4–0,5 wird mit CHCl₃/EtOH (2:1) eluiert und ergibt nach Einengen 0,283 g (61%) amorphes Festprodukt. Durch Umkristallisation aus AcOEt lassen sich Kristalle mit Schmp. 202–210° gewinnen.

C₂₀H₃₃N₅O₆Si (467,6) Ber. C 51,37 H 7,11 N 14,98% Gef. C 51,30 H 7,47 N 15,21%

2.8. 2', 5'-Bis-O-(tert-butyl dimethylsilyl)- und 3', 5'-Bis-O-(tert-butyl dimethylsilyl)-*N*²-isobutyrylguanosin (11 bzw. 12). Verbindung 2 (2,8 g, 7,9 mmol) und 4,7 g (70 mmol) Imidazol werden in 48 ml abs. DMF gelöst. Bei 7° wird unter Rühren eine Lösung von 5,2 g (34 mmol) TBDMSCl in 24 ml abs. DMF während 5 Min. zugegropft. Man entfernt dann die Kühlung und lässt nach 50 Min. bei RT. unter Rühren reagieren. Danach wird unter intensivem Rühren in 1 l Eis/H₂O getropft und der erhaltene Niederschlag im Vakuumexsikkator getrocknet. Die Substanz wird in CHCl₃/MeOH (5:3) gelöst, auf 7 präp. Kieselgelplatten (40×20×0,2 cm) aufgetragen und mit Et₂O/Petroläther (9:1) entwickelt. Nach Verdunsten des Lösungsmittels wird noch einmal mit reinem Et₂O entwickelt, wobei sich im wesentlichen 3 Zonen separieren, die mit CHCl₃/EtOH (2:1) eluiert werden. Aus der am weitesten wandernden schmalen Bande mit R_F=0,95 gewinnt man 0,13 g (2%) 13. Die Zone mit R_F≈0,85 liefert nach Einengen 0,87 g (19%) 12. Aus der breitesten Zone mit R_F=0,7 gewinnt man 1,35 g (29%) 11, das in wenig Aceton gelöst und dann unter Rühren langsam in 50 ml Pentan getropft wird. Es scheiden sich feine Nadeln mit Schmp. 202–204° ab.

C₂₆H₄₇N₅O₆Si₂ (581,9) Ber. C 53,67 H 8,14 N 12,04% Gef. C 53,71 H 8,11 N 11,82%

Die Fraktion mit 12 ist chromatographisch nicht ganz einheitlich und wird daher nochmals über präp. Kieselgelplatten in der Weise getrennt, dass pro Platte lediglich 50 mg Substanz aufgegeben

werden. Man entwickelt wie voranstehend beschrieben und gewinnt aus der Hauptzone nach Einengen einen amorphen Feststoff, der ab 128° erweicht und bei 180–183° schmilzt.

$C_{26}H_{47}N_5O_6Si_2$ (581,9) Ber. C 53,67 H 8,14 N 12,04% Gef. C 53,69 H 7,95 N 11,93%

2.9. 2',3',5'-Tris-O-(tert-butylidimethylsilyl)-N²-isobutyrylguanosin (**13**). Verbindung **2** (2,12 g, 6,00 mmol) und 7,1 g (0,1 mol) Imidazol werden in 36 ml abs. DMF gelöst, und bei RT. wird unter Rühren eine Lösung von 7,9 g (53 mmol) TBDMSCl in 25 ml abs. DMF während 5 Min. zugetropft. Nach 21 Std. wird die Reaktionslösung unter kräftigem Rühren in 300 ml Eis/H₂O getropft, wobei das Produkt teils flockig, teils klebrig ausfällt. Man saugt ab und löst den an der Gefässwand haftenden Teil sowie den Filtrückstand in 100 ml CHCl₃. Nach Trocknen wird eingeeengt und das erhaltene Öl mit 1 ml Et₂O behandelt. Dann wird langsam 40 ml Pentan unter Rühren zugegeben. Es tritt langsam Kristallisation ein und nach 2 Std. wird das Produkt gesammelt. Nach Trocknen bei 50° im Vakuumexsikkator werden 2,3 g (55%) farblose Kristalle mit Schmp. 266° erhalten.

$C_{32}H_{61}N_5O_6Si_3$ (696,1) Ber. C 55,21 H 8,83 N 10,06% Gef. C 55,27 H 8,78 N 10,07%

2.10. 2',3'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)-N²-isobutyrylguanosin (**14**). Verbindung **13** (1,4 g, 3,9 mmol) wird in 160 ml AcOH bei 30° gerührt, bis **13** chromatographisch nicht mehr nachweisbar ist. Man entfernt den grössten Teil von AcOH i.V. bei 30° und giesst die restliche Lösung in eisgekühlte ges. NaHCO₃-Lösung. Der abgeschiedene Niederschlag wird gesammelt, mit H₂O gewaschen und nach Trocknen im Vakuumexsikkator in 16 ml CHCl₃/Äthylmethylketon (1:1) gelöst. Man trägt auf 6 präp. Kieselgelplatten (40×20×0,2 cm) auf, entwickelt mit CHCl₃/Äthylmethylketon (1:2) und eluiert die Hauptbande mit R_f=0,6–0,7 mit CHCl₃/EtOH (2:1). Nach Einengen des Eluats wird der Rückstand in 2 ml MeOH gelöst. Nach Stehenlassen scheiden sich 0,94 g (41%) farblose Kristalle mit Schmp. 137–150° ab.

$C_{26}H_{47}N_5O_6Si_2$ (581,9) Ber. C 53,67 H 8,14 N 12,04% Gef. C 53,62 H 8,22 N 11,86%

2.11. 2',3',5'-Tris-O-(tert-butylidimethylsilyl)guanosin [**15**] (**15**). Verbindung **6** (40 mg, 0,055 mmol) oder **13** (35 mg, 0,050 mmol) wird jeweils in 1 ml 0,1M methanolischer Et₃N-Lösung gelöst und 60 Std. bei RT. gerührt. Der Reaktionsansatz wird auf eine präp. Kieselgelplatte (20×20×0,2 cm) gegeben und mit CHCl₃/EtOH (2:1) entwickelt und auch mit diesem Gemisch die Hauptbande eluiert. Nach Einengen wird der glasige Rückstand aus Dioxan lyophilisiert. Aus **6** werden 31 mg (81%) und aus **13** werden 27 mg (86%) farblofes Festprodukt gewonnen.

$C_{28}H_{55}N_5O_5Si_3$ (626,0) Ber. C 53,72 H 8,86 N 11,19% Gef. C 53,47 H 9,12 N 11,41%

3. Allgemeine Vorschrift für N²-Acyl-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)guanosin-3'- oder -2'-diphenyl-, -bis(2-chlorphenyl)- und -(2-chlorphenyl)(2,2,2-trichloräthyl)phosphat (**16–21** bzw. **24–29**). N²-Acyl-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)guanosin (**4**, **5**, **11** bzw. **12**; 0,5 mmol) wird in 6 ml abs. CH₃CN und 4 ml abs. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 2,0 mmol Diphenylchloridophosphat (0,54 g), Bis(2-chlorphenyl)-chloridophosphat (0,68 g) bzw. (2-Chlorphenyl)(2,2,2-trichlorethyl)chloridophosphat [**18**] (0,66 g) und 2,0 mmol 1-Methylimidazol (0,16 g) wird für die in *Tabelle 5* angegebene Zeit bei RT. gerührt. Man verdünnt mit 10 ml Toluol, engt i.V. ein und dampft noch mehrmals mit abs. Pyridin ein. Der sirupöse Rückstand wird in CHCl₃ gelöst, auf 2 präp. Kieselgelplatten (40×20×0,2 cm) aufgetragen und mit Et₂O/Pentan-Gemischen (*Tab. 5*) entwickelt. Die weitlaufende breite Bande wird mit CHCl₃/MeOH (1:1) eluiert, das Eluat eingeeengt, der Rückstand nochmals auf eine Kieselgelplatte gegeben und mit Et₂O entwickelt. Die Hauptbande wird eluiert, das Eluat eingeeengt und der Rückstand aus Dioxan oder Benzol lyophilisiert. Kristalle können erhalten werden, wenn das Lyophilisat in wenig Aceton gelöst und vorsichtig mit wenig H₂O und wenigen Tropfen MeOH versetzt wird. Die Daten von **16–21** und **24–29** sind in *Tabelle 5* aufgeführt.

4. Allgemeine Vorschrift für N²-Acyl-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)guanosin-3'- bzw. 2'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (**22**, **23** bzw. **30**, **31**). In 3 ml abs. Pyridin werden 0,25 g (1,0 mmol) (2-Chlorphenyl)dichloridophosphat und 0,14 g (2,0 mmol) 1,2,4-Triazol gelöst und 30 Min. bei RT. gerührt. Zur entstehenden Suspension setzt man 0,5 mmol N²-Acyl-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)guanosin **4**, **5** bzw. **11**, **12** zu, rührt 30 Min. bis klare Lösung eingetreten ist und gibt anschliessend für die zweite Alkoholkomponente 0,5 ml 2-Hydroxypropionitril zu. Es wird bis zum Reaktionsende (s. *Tab. 5*) gerührt, bei 30° i.V. eingeeengt und dann noch 2mal mit je 4 ml Benzol eingedampft. Man

löst in wenig CHCl_3 , trägt auf eine präp. Kieselgelplatte ($40 \times 20 \times 0,2$ cm) auf und entwickelt 3mal mit Et_2O . Die breite Zone in der Plattenmitte wird mit $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (2:1) eluiert, das Eluat eingengt und der Rückstand nach erneutem Lösen in CHCl_3 nochmals über eine Kieselgelplatte durch 2malige Entwicklung mit Et_2O chromatographiert. Die Hauptbande wird eluiert, eingengt und der Rückstand aus Benzol lyophilisiert. Die Daten von **22**, **23**, **30** und **31** sind in *Tabelle 5* aufgeführt.

5.1. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-N²-isobutyryl-5'-O-(4-methoxytrityl)guanosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2',3'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-N²-isobutyrylguanosin (**39**). Triäthylammonium-[2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-N²-isobutyryl-5'-O-(4-methoxytrityl)guanosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] [14] (**33**; 0,227 g, 0,220 mmol), 0,116 g (0,200 mmol) **14** [15] und 0,167 g (0,440 mmol) TPS-NT werden nach 6stdg. Trocknen bei $50^\circ/10^{-3}$ Torr mit 3 ml abs. Pyridin versetzt und bei 5° 24 Std. gerührt. Man nimmt das Gemisch in 200 ml CHCl_3 auf, schüttelt 3mal mit je 200 ml 0,01M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na_2SO_4) und dampft anschliessend ein. Man löst den Rückstand in CH_2Cl_2 , gibt auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (1×20 cm) und chromatographiert nacheinander mit 400 ml CH_2Cl_2 und 1,2 l $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97:3). Das Produkt wird in der Fraktion 500–1100 ml eluiert und hieraus durch Einengen gewonnen. Der feste, gelbliche Rückstand wird zur Reinigung über eine GFS-Kieselgelsäule, Typ B ($N = 7000$) mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Petroläther}/\text{MeOH}$ (100:10:2,5) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 28 ml/Min. chromatographiert. Es werden hierbei die beiden Diastereomeren zum Teil getrennt, jedoch dann die mittlere Hauptfraktion gemeinsam isoliert. Man engt die Hauptfraktion ein, löst in wenig CHCl_3 und tropft unter Rühren in 150 ml Hexan, wonach 0,219 g (74%) farbloser Feststoff erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3) des zuerst eluierten Diastereomeren: 3,72 (s, 3 H, OCH_3); 6,37–6,56 (m, 2 H, H–C(1')); 6,75 (d, $J = 9$, 2 H, *o*-Anisyl-H); 7,67 und 7,80 (2 s, 2 H, H–C(8)); 9,81 und 11,85 (2 s, 2 H, NH); des zweiten Diastereomeren aus der Nachfraktion: 3,75 (s, 3 H, CH_3O); 5,69 (d, $J = 8$, 1 H, H–C(1')); 6,75 (d, $J = 9$, 2 H, *o*-Anisyl-H); 7,57 und 7,67 (2 s, 2 H, H–C(8)); 10,61 und 10,84 (2 s, 2 H, NH).

$\text{C}_{72}\text{H}_{98}\text{ClN}_{10}\text{O}_{15}\text{PSi}_3$ (1494,3) Ber. C 57,87 H 6,61 N 9,37% Gef. C 57,76 H 6,60 N 9,26%

5.2. N⁶-Benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2',3'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)adenosin (**40**). Triäthylammonium-[N⁶-benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] [14] (**35**; 0,116 g, 0,110 mmol) und 0,058 g (0,100 mmol) **14** [15] werden nach 4stdg. Trocknen bei $50^\circ/10^{-3}$ Torr mit 59 mg (0,22 mmol) MS-NI und 2 ml abs. Pyridin versetzt und 24 Std. bei 22° gerührt. Man nimmt das Gemisch in 150 ml CHCl_3 auf, schüttelt 3mal mit je 150 ml 0,01M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na_2SO_4) und engt i.V. ein. Der bräunliche Rückstand wird in CH_2Cl_2 gelöst, auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (1×20 cm) gegeben und nacheinander mit 300 ml CH_2Cl_2 und 900 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:1) chromatographiert. Das gesuchte Produkt wird in der Fraktion 500–800 ml eluiert und hieraus durch Einengen gewonnen. Man nimmt den Rückstand erneut in wenig CH_2Cl_2 auf, gibt auf eine GFS-Kieselgelsäule, Typ C ($N = 12000$), und chromatographiert mit $\text{CCl}_4/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:15:1) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 28 ml/Min., wobei der Produkt-Peak nach ca. 310 Min. sein Maximum aufweist. Diese Fraktion wird eingengt, in wenig CH_2Cl_2 gelöst und in 80 ml Hexan unter Rühren getropft. Man erhält 91 mg (60%) farblosen Feststoff. $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): 3,38–3,74 (m, 5 H, H–C(5') (A^{Bz}) und OCH_3); 5,68–5,77 (m, 1 H, H–C(1')); 6,21–6,28 (m, 1 H, H–C(1')); 6,77 (d, $J = 9$, 2 H, *o*-Anisyl-H); 7,65 (s, 1 H, H–C(8) (G^{isB})); 7,97–8,07 (m, 2 H, Benzoyl-H); 8,21 (s, 1 H, H–C(2) (A^{Bz})); 8,70 (s, 1 H, H–C(8) (A^{Bz})); 8,96 (s, 1 H, NH (A^{Bz})); 9,95 und 11,83 (2 s, 2 H, NH (G^{isB})).

$\text{C}_{75}\text{H}_{96}\text{ClN}_{10}\text{O}_{14}\text{PSi}_3$ (1512,3) Ber. C 59,56 H 6,40 N 9,26% Gef. C 59,55 H 6,38 N 9,29%

5.3. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-N²-isobutyryl-5'-O-(4-methoxytrityl)guanosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-N²-isobutyrylguanosin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (**41**). Verbindung **33** [14] (0,567 g, 0,550 mmol) und 0,356 g (0,500 mmol) 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)guanosin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat [14] (**34**) werden 6 Std. bei $50^\circ/10^{-3}$ Torr getrocknet, dann 0,419 g TPS-NT und 5 ml abs. Pyridin zugegeben. Nach 20stdg. Rühren bei 5° wird in 200 ml CHCl_3 aufgenommen und 3mal mit je 200 ml 0,01M Phosphatpuffer pH 7 ausgeschüttelt. Nach Trocknen der org. Phase (Na_2SO_4) wird eingedampft, der Rückstand in CH_2Cl_2 gelöst und auf eine Kieselgelsäule (1×20 cm) gegeben. Man chromatographiert zunächst mit 300 ml CH_2Cl_2 und dann mit 1,6 l $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (96:4). Das gesuchte Produkt wird zwischen 700 und 1500 ml

Tabelle 5. N²-A_{cyl}-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)guanosin-2'- oder -3'-phosphotriester

Nr.	g	Reaktionsdauer Min.	Chromatographie-System für Plattenreinigung	Ausbeute		Nuc-leotid	Summenformel	Mol-masse	Analyse					
				g	%				C	H	N			
4	0,307	30	Et ₂ O/Pentan (3:2)	0,229	54	16	C ₄₁ H ₅₄ N ₅ O ₉ PSi ₂	848,0	Ber. 58,07	6,41	8,25	Ber. 58,31	6,66	8,19
4	0,307	45	Et ₂ O/Pentan (4:1)	0,30	65	17	C ₄₁ H ₅₂ Cl ₂ N ₅ O ₉ PSi ₂	919,6	Ber. 53,72	5,71	7,64	Gef. 53,56	5,93	7,89
11	0,29	5	Et ₂ O/Pentan (3:2)	0,216	53	18	C ₃₈ H ₅₆ N ₅ O ₉ PSi ₂	814,0	Ber. 56,07	6,93	8,60	Gef. 55,93	6,83	8,50
11	0,29	30	Et ₂ O/Pentan (4:1)	0,225	51	19	C ₃₈ H ₅₄ Cl ₂ N ₅ O ₉ PSi ₂	882,8	Ber. 51,69	6,16	7,93	Gef. 51,50	6,41	7,90
5	0,307	120	Et ₂ O/Pentan (7:3)	0,144	34	24	C ₄₁ H ₅₄ N ₅ O ₉ PSi ₂	848,0	Ber. 58,07	6,41	8,25	Gef. 57,87	6,61	8,08
5	0,305	120	Et ₂ O/Pentan (7:3)	0,33	72	25	C ₄₁ H ₅₂ Cl ₂ N ₅ O ₉ PSi ₂	916,6	Ber. 53,72	5,71	7,64	Gef. 53,63	5,95	7,93
12	0,29	10	Et ₂ O/Pentan (3:1)	0,163	40	26	C ₃₈ H ₅₆ N ₅ O ₉ PSi ₂	814,0	Ber. 56,07	6,93	8,60	Gef. 56,32	7,17	8,56
12	0,29	45	Et ₂ O	0,088	20	27	C ₃₈ H ₅₄ Cl ₂ N ₅ O ₉ PSi ₂	882,8	Ber. 51,69	6,16	7,93	Gef. 51,99	6,42	7,94
4	0,307	5	Et ₂ O/Pentan (7:3)	0,126	27	20	C ₃₇ H ₅₀ Cl ₄ N ₅ O ₉ PSi ₂	937,7	Ber. 47,39	5,36	7,46	Gef. 47,11	5,44	7,17
11	0,29	10	Et ₂ O/Pentan (7:3)	0,144	32	21	C ₃₄ H ₅₂ Cl ₄ N ₅ O ₉ PSi ₂	903,4	Ber. 45,20	5,79	7,75	Gef. 45,52	5,93	7,95
4	0,307	15	Et ₂ O/Pentan (7:3)	0,131	28	28	C ₃₇ H ₅₀ Cl ₄ N ₅ O ₉ PSi ₂	937,7	Ber. 47,39	5,36	7,46	Gef. 47,24	5,54	7,32
11	0,29	60	Et ₂ O/Pentan (3:1)	0,185	41	29	C ₃₄ H ₅₂ Cl ₄ N ₅ O ₉ PSi ₂	903,4	Ber. 45,20	5,79	7,75	Gef. 45,32	5,91	7,75
4	0,307	90	Et ₂ O	0,08	18	22	C ₃₈ H ₅₂ ClN ₆ O ₉ PSi ₂	859,4	Ber. 53,11	6,09	9,77	Gef. 52,98	6,02	10,00
11	0,29	210	Et ₂ O	0,10	24	23	C ₃₅ H ₅₄ ClN ₆ O ₉ PSi ₂	825,4	Ber. 50,93	6,59	10,18	Gef. 50,69	6,51	10,31
5	0,307	240	Et ₂ O	0,198	46	30	C ₃₈ H ₅₂ ClN ₆ O ₉ PSi ₂	859,4	Ber. 53,11	6,09	9,77	Gef. 53,20	6,18	9,88
12	0,29	600	Et ₂ O	0,09	22	31	C ₃₅ H ₅₄ ClN ₆ O ₉ PSi ₂	825,4	Ber. 50,93	6,59	10,18	Gef. 51,09	6,35	10,25

eluiert und aus dieser Fraktion durch Einengen als fester Rückstand gewonnen. Zur weiteren Reinigung wird nach Lösen in wenig CH_2Cl_2 auf eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ C (N=11900), gegeben und mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:6) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 32 ml/Min. chromatographiert. Der Produkt-Peak hat eine Retentionszeit von 42 Min. Man fängt die Hauptfraktion auf, engt ein, löst erneut in wenig CH_2Cl_2 und tropft unter Rühren in 500 ml Hexan. Der Niederschlag liefert 0,704 g (87%) farblosen Feststoff. $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): 2,84 (m, 2 H, CH_2CN); 3,76 (m, 5 H, $\text{H-C}(5')$ und CH_3O); 6,01 (d, $J=4$, 1 H, $\text{H-C}(1')$); 7,96 (s, 2 H, $\text{H-C}(8)$); 11,86 und 11,96 (2 s, 2 H, NH).

$\text{C}_{75}\text{H}_{91}\text{Cl}_2\text{N}_{11}\text{O}_{18}\text{PSi}_2$ (1623,7) Ber. C 55,48 H 5,65 N 9,49% Gef. C 55,28 H 5,72 N 9,23%

5.4. 2'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)guanosyl-[3'- $[\text{O}^{\text{P}}(2\text{-chlorphenyl})]$]-5'-2'-O-(tert-butyl-dimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)guanosin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (42). Verbindung 41 (0,162 g, 0,100 mmol) wird in 10 ml einer Lösung aus 2 g TsOH und 100 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (4:1) gelöst und 60 Min. bei RT. gerührt. Man verdünnt mit 200 ml CHCl_3 , schüttelt 3mal mit 200 ml 0,01M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na_2SO_4) und dampft zur Trockne ein. Der farblose Rückstand wird in CH_2Cl_2 gelöst, auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (1 \times 20 cm) gegeben und mit 200 ml CH_2Cl_2 gefolgt von 1,1 l $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97:3) chromatographiert. Das gesuchte Produkt wird ab 450 ml eluiert. Man engt diese Fraktion ein und gibt den Rückstand nach Lösen in wenig CH_2Cl_2 auf eine GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N=5900), und chromatographiert mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Petroläther}/\text{MeOH}$ (100:10:4) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 23 ml/Min. Der Produkt-Peak hat eine Retentionszeit von 27 Min. Man engt diese Hauptfraktion ein, löst in 3 ml CH_2Cl_2 und tropft unter Rühren in 200 ml Hexan, wobei sich 0,13 g (96%) farbloser Feststoff abscheiden. $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): 2,40–2,87 (m, 5 H, CH, CH_2CN und $\text{H-C}(5')$); 3,79–4,02 (m, 2 H, $\text{H-C}(5')$); 6,01 (d, $J=8$, 1 H, $\text{H-C}(1')$); 7,76 (s, 1 H, $\text{H-C}(8)$); 8,04 und 8,10 (2 s, 1 H, $\text{H-C}(8)$, zwei Diastereomere); 8,63 und 10,08 (2 s, 2 H, NH).

$\text{C}_{55}\text{H}_{75}\text{Cl}_2\text{N}_{11}\text{O}_{17}\text{PSi}_2$ (1351,3) Ber. C 48,89 H 5,59 N 11,40% Gef. C 48,79 H 5,67 N 11,76%

5.5. Triäthylammonium-[2'-O-(tert-butyl-dimethylsilyl)-N²-isobutyryl-5'-O-(4-methoxytrityl)guanosyl-3'- $[\text{O}^{\text{P}}(2\text{-chlorphenyl})]$]-5'-2'-O-(tert-butyl-dimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)guanosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat (43). Verbindung 42 (0,325 g, 0,200 mmol) wird mit 5 ml Pyridin, 5 ml Et_3N und 0,5 ml H_2O 1 Std. bei RT. gerührt. Man gibt 20 ml Pyridin zu, engt ein und dampft anschliessend noch 3mal mit je 30 ml Toluol ein. Der Rückstand wird nach Lösen in wenig CH_2Cl_2 auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (0,5 \times 10 cm) gegeben und nacheinander mit 400 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) und 800 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$ (90:5:5) chromatographiert. Die Produktfraktion, die nach ca. 0,5 l Eluat beginnt, wird eingedampft und dann unter Zusatz von Toluol nochmals i.V. eingeengt. Der aufgeschäumte Rückstand ist chromatographisch noch nicht einheitlich und wird daher in gleicher Weise über eine Kieselgelsäule mit 1,4 l $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$ (94:3:3) gereinigt, wobei die Fraktion zwischen 0,3 und 1,3 l aufgefangen wird. Nach Einengen und zweimaligem Eindampfen mit Toluol i.V. gewinnt man einen festen Schaum, der in wenig CH_2Cl_2 gelöst und unter Rühren in 600 ml Hexan getropft wird. Der abgeschiedene Niederschlag wird bei $50^\circ/10^{-3}$ Torr über $\text{P}_2\text{O}_5/\text{Paraffin}$ getrocknet und ergibt 0,324 g (97%) farbloses, amorphes Festprodukt. $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): 1,07–1,32 (m, 9 H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 3,07 (q, 6 H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 3,61–3,73 (m, 5 H, $\text{H-C}(5')$ und CH_3O); 8,09–8,13 (2 s, $\text{H-C}(8)$); 12,13 (s, 2 H, NH).

$\text{C}_{78}\text{H}_{103}\text{Cl}_2\text{N}_{11}\text{O}_{18}\text{P}_2\text{Si}_2$ (1671,8) Ber. C 56,04 H 6,21 N 9,22% Gef. C 55,68 H 5,94 N 9,30%

5.6. N⁶-Benzoyl-2'-O-(tert-butyl-dimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'- $[\text{O}^{\text{P}}(2\text{-chlorphenyl})]$]-5'-2'-O-(tert-butyl-dimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)guanosin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (44). Verbindung 35 [14] (0,186 g, 0,180 mmol) und 0,121 g (0,17 mmol) 34 [14] werden in 2,5 ml abs. Pyridin mit 0,141 g (0,370 mmol) TPS-NT versetzt und 12 Std. bei 0° im Kühlschrank aufbewahrt. Man verdünnt mit 200 ml CHCl_3 und schüttelt 3mal mit je 200 ml 0,01M Phosphatpuffer pH 7 aus. Die org. Phase wird (Na_2SO_4) getrocknet, i.V. eingeengt und dann noch mehrmals unter Zusatz von Toluol i.V. eingedampft. Der bräunliche, feste Rückstand wird in wenig CH_2Cl_2 aufgenommen, auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (1 \times 20 cm) gegeben und mit 2 l $\text{CCl}_4/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (6:4:0,4) chromatographiert. Die Produktfraktion zwischen 1,2 und 1,8 l wird eingeengt und nach Lösen in wenig CH_2Cl_2 über eine GFS-Kieselgelsäule, Typ C (N=11000), mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (96:4) chromatographiert. Nach Einengen der Produktfraktion wird in wenig CH_2Cl_2 gelöst und unter Rühren in

200 ml Hexan getropft, wobei sich 0,167 g (60%) farbloser Feststoff abscheiden. $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): 2,74–2,88 (*m*, 2 H, CH_2CN); 3,76 (*s*, 3 H, CH_3O); 6,78 (*d*, $J=9$, 2 H, *o*-Anisyl-H); 7,68 (*s*, 1 H, H–C(8) (G^{isB})); 8,31 und 8,35 (2 *s*, 1 H, H–C(8) (A^{Bz}), Diastereomere); 8,95 (*s*, 1 H, NH (A^{Bz})); 10,04 (*s*, 1 H, NH, (G^{isB})).

$\text{C}_{78}\text{H}_{89}\text{Cl}_2\text{N}_{11}\text{O}_{17}\text{P}_2\text{Si}_2$ (1641,7) Ber. C 57,07 H 5,46 N 9,39% Gef. C 57,02 H 5,71 N 9,51%

5.7. Triäthylammonium-[N^6 -benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'- $\text{OP}^-(2\text{-chlorphenyl})$]-5']-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)- N^2 -isobutyrylguanodin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] (45). Verbindung 44 (0,493 g, 0,300 mmol) wird in 3 ml Pyridin, 3 ml Et_3N und 0,1 ml H_2O 90 Min. bei RT. gerührt. Man engt ein, dampft noch 3mal mit je 50 ml Toluol i.V. ein und gibt den bräunlichen, festen Schaum – in CH_2Cl_2 gelöst – auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (2×10 cm). Es wird nacheinander mit 200 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) und 1,2 l $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$ (90:10:5) chromatographiert. Das Produkt wird ab 0,5 l eluiert, diese Fraktion eingengt und dann noch 2mal mit 50 ml Pyridin bzw. 50 ml Toluol i.V. eingedampft. Der erhaltene Rückstand wird über eine Kieselgelsäule (1×15 cm) mit 1,8 l $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}/\text{Aceton}$ (6:4:1) gereinigt und dabei die Fraktion zwischen 0,4 und 1,7 l aufzufangen. Nach Einengen wird durch Lösen in wenig CH_2Cl_2 und Eintropfen unter Rühren in 600 ml Hexan ein amorpher Feststoff erhalten, der nach Trocknen bei $50^\circ/10^{-3}$ Torr über $\text{P}_2\text{O}_5/\text{Paraffin}$ 0,465 g (92%) wiegt. $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): 1,00–1,23 (*m*, 9 H, $\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_3$); 3,72 (*s*, 3 H, CH_3O); 6,00 (*d*, $J=7$, 1 H, H–C(1')); 6,29 (*d*, $J=7$, 1 H, H–C(1')); 7,61 (*s*, 1 H, H–C(8) (G^{isB})); 8,48 (*s*, 1 H, H–C(2)); 8,82 (*s*, 1 H, H–C(8) (A^{Bz})); 11,22, 11,61 und 11,94 (3 *s*, 3 H, NH).

$\text{C}_{81}\text{H}_{101}\text{Cl}_2\text{N}_{11}\text{O}_{17}\text{P}_2\text{Si}_2$ (1689,8) Ber. C 57,57 H 6,02 N 9,12% Gef. C 57,26 H 6,18 N 8,76%

5.8. N^4 -Benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)cytidyl-[3'- $\text{OP}^-(2\text{-chlorphenyl})$]-5']-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)- N^2 -isobutyrylguanodin-3'-(2-chlorphenyl(2-cyanäthyl)phosphat] (46). Triäthylammonium-[N^4 -benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)cytidin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] [14] (36; 0,103 g, 0,100 mmol), 0,071 g (0,100 mmol) 34 [14] und 0,059 g (0,200 mmol) MS-NI werden in 2 ml abs. Pyridin gelöst und 66 Std. bei $4-7^\circ$ gerührt. Man verdünnt mit 100 ml CHCl_3 , schüttelt 3mal mit je 100 ml 0,01M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na_2SO_4), engt i.V. ein und dampft den Rückstand noch 2mal mit je 20 ml Benzol ein. Der Rückstand wird in wenig CH_2Cl_2 gelöst, auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule ($2,5 \times 8$ cm) gegeben und mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (3:2) vorchromatographiert. Die Produktfraktion wird eingengt und der Rückstand nach Lösen in wenig CH_2Cl_2 über eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ B ($N=5900$), mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Petroläther}/\text{MeOH}$ (100:100:2) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 35 ml/Min. chromatographiert. Der Produkt-Peak hat eine Retentionszeit von 3 Std. Diese Fraktion wird eingengt und der Rückstand nach Lösen in wenig CH_2Cl_2 durch Eintropfen in Hexan unter Rühren ausgefällt, wobei 0,084 g (52%) farbloser, amorpher Feststoff erhalten werden. $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, $(\text{D}_6)\text{DMSO}$): 2,97 (*m*, 2 H, CH_2CN); 5,90 (*m*, 2 H, H–C(1')); 8,22 (*m*, 2 H, H–C(8) (G^{isB}) und H–C(6) (C^{Bz})).

$\text{C}_{77}\text{H}_{89}\text{Cl}_2\text{N}_9\text{O}_{18}\text{P}_2\text{Si}_2$ (1617,7) Ber. C 57,17 H 5,55 N 7,79% Gef. C 57,04 H 5,53 N 7,60%

5.9. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)- N^2 -isobutyryl-5'-O-(4-methoxytrityl)guanosyl-[3'- $\text{OP}^-(2\text{-chlorphenyl})$]-5']- N^6 -benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (47). Verbindung 33 [14] (0,103 g, 0,100 mmol) und 0,073 g (0,100 mmol) N^6 -Benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat [14] (37) werden 2mal mit je 3 ml abs. Pyridin i.V. zur Trockne eingengt. Man nimmt erneut in 5 ml abs. Pyridin auf, setzt 0,059 g (0,200 mmol) MS-NI zu und konzentriert auf ca. 3 ml. Es wird 60 Std. bei RT. gerührt, mit 200 ml CHCl_3 verdünnt und 3mal mit je 200 ml 0,01M Phosphatpuffer pH 7 ausgeschüttelt. Nach Trocknen der org. Phase (Na_2SO_4) wird eingengt, der Rückstand in wenig CH_2Cl_2 gelöst und auf eine «handgepackte» Kieselgelsäule (1×15 cm) gegeben. Man chromatographiert nacheinander mit 300 ml CH_2Cl_2 und 800 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5), wobei das Produkt zwischen 0,4–0,7 l eluiert wird. Nach Einengen wird der Rückstand nach Lösen in wenig CH_2Cl_2 auf eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ C ($N=12000$), gegeben und mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Petroläther}/\text{MeOH}$ (100:10:3) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 32 ml/Min. chromatographiert. Der Produkt-Peak hat eine Retentionszeit von 36 Min. Die Produktfraktion wird eingengt und der feste Schaum nach Lösen in wenig CH_2Cl_2 unter Rühren in 200 ml Hexan getropft. Der amorphe Feststoff wird getrocknet und ergibt 0,148 g (90%). $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): 2,70–2,82 (*m*, 2 H, CH_2CN); 3,74 (*s*, 3 H, CH_3O); 5,86–5,94 (*m*, 1 H, H–C(1'));

6,05–6,12 (*m*, 1 H, H–C(1′)); 6,77 (*d*, *J* = 9, 2 H, *o*-Anisyl-H); 8,13 (*s*, 1 H, H–C(2) (A^{Bz})); 8,85 und 9,01 (2 *s*, 2 H, NH).

C₇₈H₈₉Cl₂N₁₁O₁₇P₂Si₂ (1641,7) Ber. C 57,07 H 5,46 N 9,39% Gef. C 56,78 H 5,52 N 9,27%

5.10. 2′-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-N²-isobutyryl-5′-O-(4-methoxytrityl)guanosyl-[3′-³²P-(2-chlorphenyl)]5′]-N⁴-benzoyl-2′-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)cytidin-3′-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (48). Verbindung 33 [14] (0,103 g, 0,100 mmol) und 0,071 g (0,100 mmol) N⁴-Benzoyl-2′-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)cytidin-3′-(2-chlorphenyl)(cyanäthyl)phosphat [14] (38) werden 2mal mit je 3 ml abs. Pyridin i.V. eingeengt. Der Rückstand wird erneut in 5 ml abs. Pyridin gelöst und 0,059 g (0,200 mmol) MS-NI zugegeben. Nach Konzentrieren auf ca. 3 ml wird 60 Std. bei RT. gerührt. Man verdünnt mit 200 ml CHCl₃, schüttelt 3mal mit je 200 ml 0,01M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na₂SO₄) und engt ein. Der bräunliche Rückstand wird in wenig CH₂Cl₂ gelöst, auf eine Kieselgelsäule (1 × 10 cm) gegeben und nacheinander mit 300 ml CH₂Cl₂ und 1,3 l CH₂Cl₂/MeOH (97:3) chromatographiert. Die Produktfraktion zwischen 0,5 und 1,2 l wird eingeengt, der Rückstand nach Lösen in wenig CH₂Cl₂ auf eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ C (N = 12000), gegeben und mit jeweils 1,25 l CH₂Cl₂/MeOH (100:3), CH₂Cl₂/MeOH (100:4), CH₂Cl₂/MeOH (100:5) und CH₂Cl₂/MeOH (100:6) chromatographiert. Der Produkt-Peak hat bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 38 ml/Min. eine Retentionszeit von 110 Min. Man engt die Hauptfraktion ein und fällt aus CH₂Cl₂/Hexan unter Rühren um. Es scheiden sich hierbei 0,087 g (54%) amorphes Festprodukt ab. ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 2,60–2,76 (*m*, 2 H, CH₂CN); 5,82–5,97 (*m*, 2 H, H–C(1′)); 7,77–7,91 (*m*, 3 H, 2 arom. H und H–C(8)); 8,61 (*s*, 1 H, NH).

C₇₇H₈₉Cl₂N₉O₁₈P₂Si₂ (1617,7) Ber. C 57,17 H 5,55 N 7,79% Gef. C 57,25 H 5,59 N 7,92%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] D. Flockerzi, E. Uhlmann & W. Pfeleiderer, *Helv. Chim. Acta* 66, 1929 (1983).
- [2] D. Flockerzi, Dissertation, Univ. Konstanz 1980.
- [3] W. Schlosser, Dissertation, Univ. Konstanz 1978.
- [4] W. Köhler & W. Pfeleiderer, *Liebigs Ann. Chem.* 1979, 1855.
- [5] K. K. Ogilvie & D. J. Iwacha, *Tetrahedron Lett.* 1973, 317.
- [6] K. K. Ogilvie, *Can. J. Chem.* 51, 3799 (1973).
- [7] K. K. Ogilvie, E. A. Thompson, M. A. Quilliam & J. B. Westmore, *Tetrahedron Lett.* 1974, 2865.
- [8] K. K. Ogilvie, S. L. Beaucage & D. W. Enwistle, *Tetrahedron Lett.* 1976, 1255.
- [9] K. K. Ogilvie, S. L. Beaucage, D. W. Enwistle, E. A. Thompson, M. A. Quilliam & J. B. Westmore, *J. Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides* 3, 197 (1976).
- [10] K. K. Ogilvie, S. L. Beaucage, A. L. Schiffman, N. Y. Theriault & K. Sadana, *Can. J. Chem.* 56, 2768 (1978).
- [11] K. K. Ogilvie, A. L. Schiffman & C. L. Penney, *Can. J. Chem.* 57, 2230 (1979).
- [12] J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, G. R. Owen, C. B. Reese & R. Saffhill, *J. Chem. Soc. D* 1971, 869.
- [13] J. H. van Boom, P. M. J. Burgers & P. H. van Deursen, *Tetrahedron Lett.* 1976, 869.
- [14] G. Silber, D. Flockerzi, R. S. Varma, R. Charubala, E. Uhlmann & W. Pfeleiderer, *Helv. Chim. Acta* 64, 1704 (1981).
- [15] D. Flockerzi, G. Silber, R. Charubala, W. Schlosser, R. S. Varma, F. Creegan & W. Pfeleiderer, *Liebigs Ann. Chem.* 1981, 1568.
- [16] J. F. M. de Rooy, G. Wille-Hazeleger, P. H. van Deursen, J. Serdijn & J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 98, 537 (1979).
- [17] Prof. Dr. G. Helmchen, Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart, D. Flockerzi, Diplomarbeit, Univ. Stuttgart 1977.
- [18] J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, G. van der Marel, C. H. M. Verdegaal & G. Wille, *Nucleic Acids Res.* 4, 1047 (1977).