

266. Nucleotide, XXI¹⁾

Synthese und Eigenschaften Dihydrouridin-haltiger Oligonucleotide

von Dieter Flockerzi, Gunter Silber und Wolfgang Pfeleiderer*

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

(15.VIII.83)

Nucleotides, XXI. Synthesis and Properties of Dihydrouridine-Containing Oligonucleotides

Summary

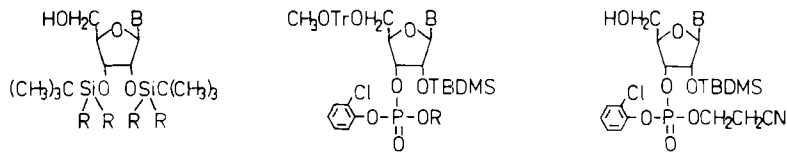
Substituted 5,6-dihydrouridine derivatives **1**, **5**, and **8** have been used in condensation reactions to form a series of dinucleosidemono- and dinucleosidediphosphotriesters, **13** and **16–22**, respectively. Dihydrouridine-containing fully blocked oligomers have also been obtained by stepwise chain-elongation and block condensations including 5 trimers (**25–29**) and one pentamer (**31**), hexamer (**32**) and octamer (**34**) each. The new compounds were characterized by UV and partly CD spectra as well as elementary analyses. NMR spectra prove the structures but are not reported in detail.

1. Einleitung. – Transferribonucleinsäuren [2] besitzen im Dihydrouridin-Loop (hU-Loop) eine interessante, ungewöhnliche Region, deren Bedeutung für die Gesamtstruktur und dreidimensionale Gestalt dieser wichtigen Biopolymeren noch nicht im einzelnen geklärt ist. Da ferner wechselnde Mengen an Dihydrouridin diesen Bereich in den verschiedenartigen tRNAs [2] aufbauen, darf dieser Modifizierung des Ribonucleosids Uridin zu seiner 5,6-Dihydro-Stufe wohl eine spezifische molekulare und biochemische Funktion zugeschrieben werden. Vom chemisch-synthetischen Standpunkt aus ist dem Dihydrouridin bislang ebenfalls noch wenig Aufmerksamkeit gewidmet worden, so dass auch seine nur marginale Verwendung bei Oligonucleotid-Synthesen [3–5] nicht überrascht.

2. Synthesen. – Wir haben uns im Rahmen der Darstellung von geeigneten Ausgangssubstanzen [6] [7] für Oligonucleotid-Synthesen auch mit dem 5,6-Dihydrouridin beschäftigt und es durch Überführung in das 2'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5'-*O*-(4-methoxytrityl)-5,6-dihydrouridin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (**4**) [7] für die geplanten Synthesevorhaben mit allgemein verwendbaren Schutzgruppen substituiert. Durch Säurebehandlung gewinnt man hieraus das 5'-OH-freie Derivat **8** [7]

¹⁾ Teil XX: [1].

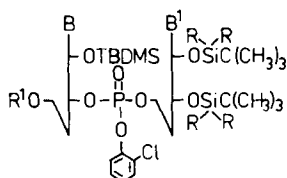
Schema 1



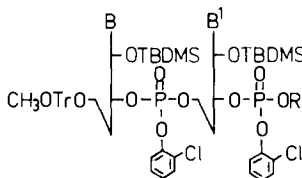
	B	R
1	hU	C ₆ H ₅
2	A ^{Bz}	CH ₃
3	G ^{isB}	CH ₃

	B	R
4	hU	CH ₂ CH ₂ CN
5	hU	HNEt ₃
6	U	HNEt ₃
7	C ^{Bz}	HNEt ₃

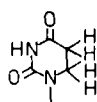
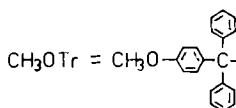
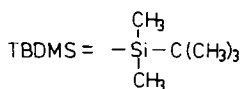
	B
8	hU
9	U
10	C ^{Bz}
11	A ^{Bz}
12	G ^{isB}



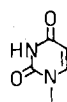
	B	B ¹	R	R ¹
13	C ^{Bz}	hU	C ₆ H ₅	CH ₃ OTr
14	A ^{Bz}	A ^{Bz}	CH ₃	CH ₃ OTr
15	A ^{Bz}	A ^{Bz}	CH ₃	H



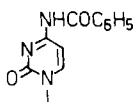
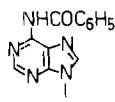
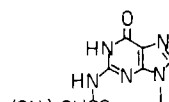
	B	B ¹	R
16	U	hU	CH ₂ CH ₂ CN
17	C ^{Bz}	hU	CH ₂ CH ₂ CN
18	hU	U	CH ₂ CH ₂ CN
19	hU	U	CH ₂ CH ₂ CN
20	hU	C ^{Bz}	CH ₂ CH ₂ CN
21	hU	A ^{Bz}	CH ₂ CH ₂ CN
22	hU	A ^{Bz}	HNEt ₃
23	G ^{isB}	G ^{isB}	HNEt ₃
24	A ^{Bz}	A ^{Bz}	HNEt ₃



hU



U

C^{Bz}A^{Bz}G^{isB}

und unter Einwirkung von Et₃N bildet sich durch Eliminierung der Cyanäthyl-Gruppe der entsprechende Phosphodiester **5** [7] als weitere Kondensationskomponente.

Eingeleitet wurden die Kondensationsexperimente mit der einfachen Umsetzung zwischen dem Triäthylammonium[*N*⁴-Benzoyl-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-*O*-(4-methoxytrityl)cytidin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] (**7**) [7] und 2',3'-*O*-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-5,6-dihydrouridin (**1**) [6], wozu Mesitylensäure-nitroimidazolid (MS-NI) als Aktivator verwendet wurde. Nach 2 Tagen Reaktionsdauer konnten 68% am vollgeschützten CphU (**13**) isoliert werden. Entsprechende Kondensationen mit dem 5'-OH-freien Dihydrouridin-phosphotriester **8** als 3-terminalem Baustein verliefen bei

Verwendung eines äquimolaren Verhältnisses von Diester- und 5'-OH-Komponente sowie der doppelten Menge an MS-NI als Kondensationsmittel ganz analog und ergaben mit den 2',5'-geschützten Phosphodiestern des Uridins (**6**), *N*⁴-Benzoylcytidins **7** und 5,6-Dihydrouridins **5** die jeweiligen vollblockierten Dinucleosid-diphosphotriester **16**, **17** and **18** in 64-, 75- und 60proz. Ausbeute.

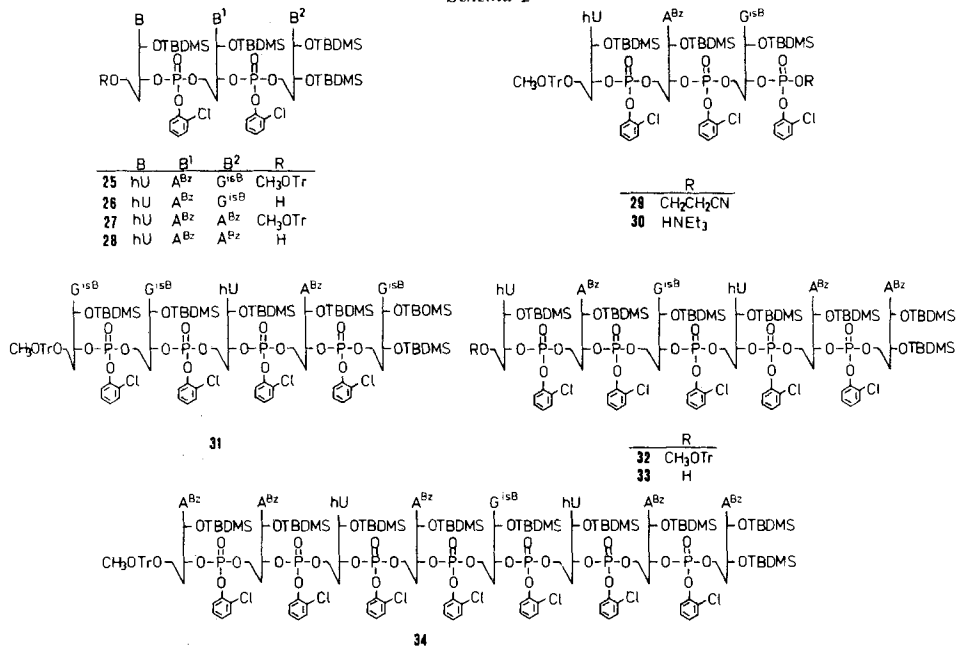
Interessant war in diesem Zusammenhang auch die umgekehrte Verknüpfungsweise, bei der der Dihydrouridin-phosphodiester **5** als 5'-terminale Komponente fungiert. Mit den 2'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphaten des Uridins **9**, *N*⁴-Benzoylcytidins **10** und *N*⁶-Benzoyladenosin **11** zeigte sich, dass unter analogen Reaktionsbedingungen die Dinucleosid-diphosphotriester der Pyrimidin-Reihe **19** und **20** wiederum mittelmässige Ausbeuten von 74 und 66% ergaben während der Einsatz des Purinphosphotriesters **11** zu **21** mit 92proz. Ausbeute realisiert werden konnte.

Durch die gute Zugänglichkeit von **21** war damit ein wertvoller Baustein für den Aufbau von Oligonucleotid-Einheiten gefunden. Seine Verseifung zum Triäthylammonium-Salz des entsprechenden Phosphodiesters **22** verlief problemlos und die anschliessenden Kondensationen mit 2',3'-*O*-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*²-(isobutyryl)guanosin (**3**) zu **25** bzw. 2'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*²-(isobutyryl)guanosin-3'-(2-chlorphenyl)-(2-cyanäthyl)phosphat (**12**) zu **29** mit Hilfe von 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäure-3-nitro-1,2,4-triazolid (TPS-NT) waren mit 87 bzw. 80% Ausbeute erstaunlich gut. Die Detritylierung von **25** mit TsOH führt zum 5'-OH-freien Derivat **26**, das als Alkoholkomponente mit dem früher synthetisierten Triäthylammonium-[2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*²-isobutyryl-5'-*O*-(4-methoxytrityl)guanylyl-[3'-[*O*^{*P*}-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*²-(isobutyryl)guanosin-3'-(2-chlorphenyl)-phosphat (**24**)]**1** in einer (3 + 2)-Blockkondensation mit TPS-NT zum vollgeschützten Pentameren **31** in 48proz. Ausbeute zur Reaktion gebracht wurde.

Eine zweite Synthesereihe wurde mit dem Ziel der Darstellung eines Octaribonucleotids aus dem Dihydrouridin-Bereich der Methionin-Initiator-tRNA von *Neurospora crassa* in Angriff genommen. Die Nucleotidsequenz ApAphUpApGphUpApA war dabei deshalb interessant, weil hierin die hU-Einheit lediglich mit Purinnucleotiden, dominiert von A, kombiniert ist. Als Strategie für den Aufbau des Octameren wurde, vom 3'-Ende her gesehen, eine (3 + 3 + 2)-Blockbauweise ausgewählt. Das endständige vollgeschützte Trimere hUpApA (**27**) resultierte aus der Kondensation von **5** mit dem früher synthetisierten *N*⁶-Benzoyl-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosyl-[3'-[*O*^{*P*}-(2-chlorphenyl)]-5']-*N*⁶-benzoyl-2',3'-*O*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin (**15**) [8], das in 75proz. Ausbeute gewonnen wurde. Bei Detritylierungsexperimenten mit dieser Substanz konnten wir feststellen, dass die normalerweise als Nebenreaktion in Erscheinung tretende und ausbeutevermindernd wirkende *N*-Debenzoylierung sehr wesentlich zurückgedrängt werden kann, wenn mit einer 2proz. Lösung von TsOH in CH₂Cl₂/MeOH (4:1) bei -10 °C gearbeitet wird. Unter diesen Bedingungen konnte das 5'-OH-freie Trimere **28** in 97proz. Ausbeute isoliert werden. Der zweite Dreierblock hUpApG in Form seines vollgeschützten Triäthylammonium-3'-phosphodiesters **30** war durch Eliminierung des Cyanäthyl-Restes aus **29** zugänglich. Die Kondensation von **30** und **28** wurde mit TPS-NT bei 5 °C durchgeführt und ergab trotz der langen Reaktionsdauer von 40 Std. einen recht einheitlichen Reaktionsverlauf, so dass nach Aufarbeitung und Trennung über eine präparative GFS-Kieselgelsäule nach dem Mitteldruckchromatographie-Verfahren [9]

76% Hexamerer **32** und noch 17% unumgesetztes **27** gewonnen werden konnte. Das hydrophobe 3'-Ende mit seinem 2',3'-*O*-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-Teil beeinflusst dabei die Chromatographie sehr positiv und erlaubt eine saubere Trennung der Komponenten. Die Detritylierung von **32** bei -18°C sah dünnschichtchromatographisch ebenfalls sehr gut aus und trotzdem konnten aus der chromatographischen Aufarbeitung lediglich nur 81% analysenreines Produkt **33** isoliert werden. Die letzte Stufe der Octameren-Synthese schloss dann die Umsetzung von **33** mit dem Triäthylammonium- $[N^6$ -benzoyl-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-*O*-(4-methoxytrityl)adenosyl- $[3'$ - $[O^P$ -(2-chlorphenyl)-3']- N^6 -benzoyl-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] (**24**) [8] in sich ein. Bei $+5^{\circ}\text{C}$ mit TPS-NT als Kondensationsmittel war nach 20 Std. die 5'-OH-Komponente verschwunden und es wurde wie üblich aufgearbeitet und durch präparative Mitteldruckchromatographie gereinigt. Bei Anwendung eines Gradienten aus CH_2Cl_2 /Petroläther/MeOH trat nur leichte Schwanzbildung auf und das vollgeschützte Octamere **34** konnte in 79prozentiger Ausbeute rein isoliert werden. Die problemlose Reinigung bestätigte hierbei erneut, dass ein endständiges Nucleosid mit lipophilen Ribose-Schutzgruppen eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Oligonucleotid-Synthese darstellt.

Schema 2



3. Physikalische Eigenschaften. - Zur Charakterisierung der verschiedenartigen Oligonucleotide dienen neben den Elementaranalysen in erster Linie die UV-Absorptionsspektren, deren Banden-Maxima und Extinktionen in der *Tabelle* zusammengefaßt sind. Die ebenfalls bestimmten $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sind verständlicherweise zu komplex, als dass sie im Rahmen dieser Arbeit als zusätzliche Strukturbeweise angeführt werden könnten.

Tabelle. UV- und CD-Spektren von Oligonucleotiden in MeOH

Verbindung	UV-Absorptionsspektren ^{a)}		lg ε	CD-Spektren		θ
	λ _{max} [nm]			λ [nm]		
13	262	304	4,43			
16	[230] 261		[4,24] 4,07	[240] 270	[+ 5100] + 15300	
17	233 261	305	4,39 4,41	[250] 305	[- 18000]	+ 34000
18	[231] 265	[281]	[4,23] 3,44			
19	[230] 259		[4,25] 4,05	235		
20	[232] 261	304	[4,41] 4,43	[245] 272	[+ 4700] + 10200	+ 17800
21	[230] 279		[4,48]	230 255	+ 4000 - 6300	+ 8700
22	[231] 277		[4,48]	230 260	+ 17300 - 8700	- 8700
25	232 [255] 261	280	4,52 [4,46]	225 255	+ 5500 - 6300	- 8700
26	[256] 261	280	[4,45]	233 250	- 10000 - 13600	- 4000 - 11000
27	[228] 280		[4,70]	232 282	+ 28300	- 25000
28	[232] 279		[4,46]	231 276	+ 22000	- 22000
29	232 258	261 280	4,54 4,47	235 [262] 285	+ 4400 [- 7500]	- 13800
30	236 253	261 278	4,52 4,47			
31	[238] [255] 260	279	[4,67] [4,79]	230 245	- 2800 - 11800	+ 8700
32	[232] 253	[262] 280	[4,78] 4,72	236 260	- 26800 - 19700	- 19600 - 31500
33	[234] [253] 272	280 [326]	[4,66] [4,69]	232 266	+ 38600 - 7900	- 7800 - 16500
34	233 254	261 280	4,94 4,88	232 [265] 282	+ 54300 [- 37800]	- 51200

^{a)} Schulter in eckigen Klammern.

Zur Entfernung der Schutzgruppen, die wir aus Analogie-Gründen bei **27**, **32** und **34** durchgeführt haben, sind wir in der Weise verfahren, dass zunächst mittels der Oximat-Methode von *Reese et al.* [10] die Phosphotriester- zur Diester-Funktion verseift, dann mittels Fluorid-Ionen in Pyridin die Silyl-Schutzgruppen und anschließend mit NH_3 die Benzoyl-Reste abgespalten wurden. Danach wurde über eine *DEAE-Sephadex*-Kolonnen unter Anwendung eines Triäthylammoniumbicarbonat-Gradienten gereinigt und nach Isolierung des Hauptproduktes und Entfernung des überschüssigen Salzes durch mehrfaches Abotrieren mit Wasser dann erst der Monomethoxytrityl-Rest in 80proz. AcOH entfernt. Es hat sich gezeigt, dass die Austauscher-Chromatographie mit wachsender Kettenlänge schwieriger wird, wogegen die Anwesenheit des 5'-ständigen 4-Methoxytrityl-Restes, vermutlich infolge einer stärkeren Behinderung zur Selbstaggregation, das chromatographische Wanderungsverhalten sehr günstig beeinflusst.

Von einer Reihe der Oligonucleotide haben wir zur weiteren Charakterisierung zusätzlich ihre CD-Spektren in MeOH aufgenommen. Aufgrund der Gegenwart zahlreicher Schutzgruppen nehmen wir an, dass offene, relativ gestreckte Konformationen vorliegen und intramolekulare Wechselwirkungen, wie sie bei den entschützten Vertretern im «Stacking-Effekt» der Purin- und Pyrimidin-Basen zum Ausdruck kommen, nicht vorhanden sind.

Erwartungsgemäss sind die CD-Spektren von **27** und **28** sehr ähnlich, wogegen der Austausch der 3'-terminalen A^{Bz} - in **28** gegen die G^{isB} -Komponente (**26**, **29**) eine starke Veränderung speziell im kurzwelligen Bereich zur Folge hat. Die Hexameren **32** und **33** sind aus den entsprechenden trimeren Untereinheiten **25–28** zusammengesetzt, was sich dann im additiven Charakter ihrer CD-Spektren widerspiegelt. Ein entsprechendes Spektrum zeigt auch das Octamere **34**, bei dem sich das Übergewicht am A^{Bz} -Anteil in extrem hohen Elliptizitäten kundtut. Das Pentamere **31** steht demgegenüber allein im Raum und weist durch die Anhäufung von Guanosin-Resten ein völlig anderes CD-Spektrum mit einem langwelligen positiven *Cotton*-Effekt auf und schließt sich somit an die Eigenschaften, die schon bei den einfachen GpG-Dimeren festgestellt wurden [11], an.

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 Bestimmung der physikalischen Daten.

Experimenteller Teil

1. Allgemeines. Vgl. [11].

2. *Synthesen von Nucleotiden und Oligonucleotiden.* – 2.1. N^4 -Benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)cytidyl-[3'- $\text{I}^{\text{O}^{\text{P}}}$ -(2-chlorphenyl)]-5'-J-2',3'-O-bis-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-5,6-dihydrouridin (**13**). Triäthylammonium-[N^4 -benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)cytidin-3'-(2-chlorphenyl)-phosphat] (**7**; 0,205 g, 0,2 mmol) [**7**], 0,114 g (0,2 mmol) 2',3'-O-Bis-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-5,6-dihydrouridin (**1**) [**6**] und 0,12 g (0,4 mmol) MS-NI werden in 4 ml abs. Pyridin gelöst und 2 Tage bei RT. unter Feuchtigkeitsabschluss gerührt. Man verdünnt mit 200 ml CH_2Cl_2 und schüttelt 3mal mit je 150 ml Phosphatpuffer pH 7 aus. Die org. Phase wird getrocknet (Na_2SO_4), i.V. einrotiert und dann der Rückstand noch 2mal mit je 50 ml Benzol koevaporiert. Man gibt dann auf eine handgestopfte Kieselgelsäule (2,5 × 12 cm) und entwickelt im Gemisch $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (3:2), fängt die Hauptfraktion auf, engt erneut ein und reinigt dann weiter durch präp. Mitteldruckchromatographie über eine GFS-Säule, Typ B (N = 5900), mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Petroläther}/\text{MeOH}$ (100:100:1) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 30 ml/Min. Die Hauptfraktion, die mit einer t_R von 1 Std. 45 Min. eluiert wird, wird dann eingeeengt, in wenig CH_2Cl_2 gelöst und langsam unter Rühren in Hexan eingetropfelt; 0,223 g (68%) farbloses Pulver werden erhalten.

$\text{C}_{89}\text{H}_{99}\text{ClN}_5\text{O}_{15}\text{PSi}_3$ (1629,5) Ber. C 65,60 H 6,12 N 4,30% Gef. C 65,67 H 6,08 N 4,35%

2.2. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)uridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5,6-dihydrouridin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (**16**). Triäthylammonium-[2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)uridin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] (**6**; 0,101 g, 0,17 mmol) [**7**], 0,157 g (0,17 mmol) 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5,6-dihydrouridin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (**8**) [**7**] und 0,1 g (0,34 mmol) MS-NI werden in 3,4 ml abs. Pyridin gelöst und 2 Tage bei RT. gerührt. Man nimmt das Gemisch in 100 ml CHCl₃ auf, schüttelt 3mal mit je 100 ml Phosphatpuffer pH 7 aus und trocknet die org. Phase (Na₂SO₄). Dann wird eingeeengt, der Rückstand noch 2mal mit je 20 ml Benzol koevaporiert und dann auf eine handgestopfte Kieselgelsäule (2,5 × 8 cm) aufgegeben und im System CH₂Cl₂/AcOEt (1:1) vorgereinigt. Die Hauptfraktion wird gesammelt, erneut eingeeengt und dann über eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ C (N = 11000), mit CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH (25:25:1) weiter gereinigt. Man arbeitet nach dem Mitteldruckverfahren mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 32 ml/Min., wobei die Hauptfraktion ihr Maximum nach ca. 80 Min. besitzt. Diese Fraktion wird gesammelt, eingeeengt, in wenig CH₂Cl₂ gelöst und unter Rühren in Hexan eingetropft. Man gewinnt so 0,154 g (64%) farbloses Pulver.

C₆₅H₇₉Cl₂N₄O₁₈P₂Si₂ (1407,4) Ber. C 55,47 H 5,66 N 4,98% Gef. C 55,71 H 5,70 N 5,14%

2.3. N⁴-Benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)cytidyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5,6-dihydrouridin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (**17**). Verbindung **7** (0,103 g, 0,1 mmol), 0,06 g (0,1 mmol) **8** und 0,06 g (0,2 mmol) MS-NI werden in 2 ml Pyridin gelöst und 3 Tage unter Feuchtigkeitsausschluss bei RT. gerührt. Man nimmt das Gemisch in 100 ml CHCl₃ auf, schüttelt 3mal mit je 100 ml Phosphatpuffer pH 7 aus und trocknet die org. Phase. Nach Abrotieren wird der Rückstand noch 2mal mit je 20 ml Benzol koevaporiert und dann die Substanz auf eine handgestopfte Kieselgelsäule (2,5 × 8 cm) aufgegeben. Man chromatographiert mit CH₂Cl₂/AcOEt (1:1), fängt die Hauptfraktion auf, engt ein und reinigt dann nochmals durch präp. Mitteldruckchromatographie über eine GFS-Säule, Typ C (N = 11000), mit CH₂Cl₂/Petroläther/MeOH (25:25:1). Die Durchflussgeschwindigkeit beträgt 30 ml/Min., wobei das gesuchte Reaktionsprodukt nach ca. 90 Min. eluiert wird. Die Hauptfraktion wird wieder eingeeengt, in wenig CH₂Cl₂ gelöst und dann unter Rühren in Hexan langsam eingetropft. Man gewinnt so 0,113 g (75%) farbloses Pulver.

C₇₂H₈₄Cl₂N₆O₁₈P₂Si₂ (1510,5) Ber. C 57,25 H 5,61 N 5,56% Gef. C 57,21 H 5,48 N 5,63%

2.4. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5,6-dihydrouridin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (**18**). Triäthylammonium-[2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)-5,6-dihydrouridin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] (**5**; 0,092 g, 0,1 mmol) [**6**], 0,06 g (0,1 mmol) **8** und 0,06 g (0,2 mmol) MS-NI werden in 2 ml Pyridin gelöst und 2 Tage bei RT. gerührt. Man nimmt das Gemisch in 100 ml CHCl₃ auf, schüttelt 3mal mit je 100 ml Phosphatpuffer pH 7 aus und trocknet die org. Phase (Na₂SO₄). Nach Abrotieren wird noch 2mal mit je 20 ml Benzol koevaporiert und dann auf eine handgestopfte Kieselgelsäule (2,5 × 8 cm) aufgegeben. Man entwickelt mit CH₂Cl₂/AcOEt (1:1), sammelt die Hauptfraktion, engt ein und reinigt dann durch präp. Mitteldruckchromatographie über eine GFS-Säule, Typ B (N = 5900), mit CH₂Cl₂/Petroläther/MeOH (100:100:3). Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 26 ml/Min. erscheint die Hauptfraktion nach 25 Min. Sie wird gesammelt, einrotiert, in wenig CH₂Cl₂ gelöst und dann durch langsames Eintropfen in Hexan ausgefällt. Man erhält so 0,084 g (60%) farbloses Pulver.

C₆₅H₈₁Cl₂N₅O₁₈P₂Si₂ (1409,4) Ber. C 55,39 H 5,79 N 4,97% Gef. C 55,32 H 5,92 N 4,94%

2.5. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)uridin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (**19**). Verbindung **5** (0,092 g, 0,1 mmol), 0,06 g (0,1 mmol) 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)uridin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (**9**) [**7**] und 0,06 g (0,2 mmol) MS-NI werden in 2 ml abs. Pyridin gelöst und 3 Tage bei RT. gerührt. Man arbeitet analog vorstehend auf und reinigt am Ende über eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N = 5900), mit CH₂Cl₂/Petroläther/MeOH (25:25:1) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 30 ml/Min. Das Produkt wird nach ca. 15 Min. eluiert. Man engt ein, löst in wenig CH₂Cl₂ und tropft langsam unter Rühren in Hexan ein, wodurch 0,104 g (74%) farbloses Pulver ausfällt.

C₆₅H₇₉Cl₂N₅O₁₈P₂Si₂ (1407,4) Ber. C 55,47 H 5,66 N 4,98% Gef. C 55,36 H 5,65 N 4,86%

2.6. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁴-benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)cytidin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (**20**). Verbindung **5** (0,092 g, 0,1 mmol), 0,071 g (0,1 mmol) N⁴-Benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)cytidin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (**10**) [**7**] und 0,06 g (0,2 mmol) MS-NI werden in 2 ml Pyridin gelöst und 3 Tage bei RT. gerührt. Man arbeitet analog vorstehend auf und führt die präp. Mitteldruckchromatographie mit einer Kieselgelsäule, Typ

C (N = 11000), mit CH₂Cl₂/Petroläther/MeOH (100 : 100 : 3) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 30 ml/Min. durch. Das Produkt wird nach 1 Std. eluiert, man engt diese Fraktion ein, löst in wenig CH₂Cl₂ und tropft langsam unter Rühren in Hexan ein, wobei 0,1 g (66%) farbloses Pulver anfällt.

C₇₂H₈₄Cl₂N₆O₁₈P₂Si₂ (1510,5) Ber. C 57,25 H 5,61 N 5,56% Gef. C 57,14 H 5,64 N 5,69%

2.7. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)(2-cyanäthyl)phosphat (**21**). Verbindung **5** (0,457 g, 0,5 mmol), 0,365 g (0,5 mmol) **11** und 0,295 g (1 mmol) MS-NI werden nach gemeinsamen Trocknen bei 40°/10⁻³ Torr, 3 Std. in 10 ml. abs. Pyridin gelöst; dann wird das Reaktionsvolumen auf 5 ml eingengt und anschließend 3 Tage bei 22° gerührt. Man nimmt das Gemisch in 200 ml CHCl₃ auf, schüttelt 3mal mit je 200 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na₂SO₄), engt ein und koevaporiert noch 3mal mit je 50 ml Toluol. Der Rückstand wird über eine handgepackte Kieselgelsäule (2 × 20 cm) vorchromatographiert, mit 500 ml CH₂Cl₂ gefolgt von 800 ml CH₂Cl₂/MeOH (95 : 5). Die Produktfraktion, die zwischen 300 und 750 ml eluiert wird, liefert nach Einengen einen festen farblosen Schaum, der zur weiteren Reinigung über eine GFS-Kieselgelsäule, Typ C (N = 11000), mit CH₂Cl₂/MeOH (97 : 3) chromatographiert wird. Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 39 ml/Min. erscheint das Produkt mit einer t_R von 21 Min. Man engt diese Fraktion ein, löst in wenig CH₂Cl₂ und fällt durch Eintropfen in 600 ml Hexan unter Rühren 0,694 g (92%) farbloses Pulver aus.

C₇₃H₈₄Cl₂N₈O₁₇P₂Si₂ (1534,6) Ber. C 57,14 H 5,52 N 7,30% Gef. C 56,96 H 5,52 N 7,36%

2.8. Triäthylammonium-[2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)5'-O-(4-methoxytrityl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat (**22**). Verbindung **21** (0,6 g, 0,39 mmol) wird mit 4 ml Pyridin, 4 ml Et₃N und 0,1 ml H₂O 2,5 Std. bei RT. gerührt, bis das Ausgangsprodukt im Chromatogramm völlig verschwunden ist. Man engt dann ein, koevaporiert noch 3mal mit Toluol und reinigt dann durch Chromatographie über eine handgepackte Kieselgelsäule (1 × 15 cm). Man verwendet nacheinander folgende Systeme: 0,5l CH₂Cl₂, 0,5l CH₂Cl₂/MeOH (95 : 5) und 1,3l CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N (100 : 5 : 5). Die Produktfraktion wird gegen Ende eluiert, dann eingengt, der anfallende Schaum in wenig CH₂Cl₂ gelöst und dann unter Rühren in 600 ml Hexan langsam eingetropt. Man gewinnt 0,608 g (98%) farbloses Pulver.

C₇₆H₉₆Cl₂N₈O₁₇P₂Si₂ (1582,7) Ber. C 57,68 H 6,11 N 7,08% Gef. C 57,13 H 6,41 N 6,76%

2.9. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2',3'-O-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-N²-(*isobutryl*)guanosin (**25**). Verbindung **22** (0,283 g, 0,18 mmol), 0,087 g (0,15 mmol) 2',3'-O-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-N²-(*isobutryl*)guanosin (**3**) [6] und 0,14 g (0,36 mmol) T PS-NT werden zunächst für 3 Std. bei 40°/10⁻³ Torr getrocknet, dann in 3 ml abs. Pyridin gelöst und anschließend bei 5° 40 Std. gerührt. Man nimmt das Gemisch in 200 ml CHCl₃ auf, schüttelt 3mal mit je 200 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na₂SO₄), rotiert ein und koevaporiert noch 3mal mit je 50 ml Toluol. Der bräunliche feste Schaum wird über eine handgepackte Kieselgelsäule (1 × 20 cm) mit 300 ml CH₂Cl₂, 300 ml CH₂Cl₂/AcOEt (95 : 5) und 500 ml CH₂Cl₂/MeOH (95 : 5) vorchromatographiert. Die gegen Ende eluierte Produktfraktion wird eingengt und dann durch präp. Mitteldruckchromatographie über eine GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N = 7000), mit CH₂Cl₂/Petroläther/MeOH (100 : 10 : 1) weiter gereinigt. Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 25 ml/Min. erscheint das Produkt mit einer t_R von 16 Min. Man sammelt diese Fraktion, engt ein und fällt das Produkt nach Lösen in wenig CH₂Cl₂ und Eintropfen in 400 ml Hexan wieder aus, wobei 0,268 g (87%) farbloses Pulver anfallen.

C₉₆H₁₂₆Cl₂N₁₂O₂₂P₂Si₄ (2045,4) Ber. C 56,37 H 6,21 N 8,22% Gef. C 56,58 H 6,13 N 7,97%

2.10. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2',3'-O-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-N²-(*isobutryl*)guanosin (**26**). Verbindung **25** (0,205 g, 0,1 mmol) wird in 10 ml einer 2proz. Lösung von TsOH in CH₂Cl₂/MeOH (4 : 1) 1 Std. bei RT. gerührt. Man verdünnt mit 200 ml CHCl₃, schüttelt 3mal mit 200 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na₂SO₄) und engt ein. Der Rückstand wird über eine handgepackte Kieselgelsäule (1 × 20 cm) mit 300 ml/CHCl₂ und dann 1.2l CH₂Cl₂/MeOH (95 : 5) vorchromatographiert. Die Hauptfraktion wird gesammelt, eingengt und dann zur weiteren Reinigung über eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N = 7000), mit CH₂Cl₂/MeOH (97 : 3) und einer Durchflussgeschwindigkeit von 28 ml/Min. eluiert und liefert nach Einengen, Lösen in wenig CH₂Cl₂ und Eintropfen unter Rühren in Hexan 0,149 g (84%) farbloses Pulver.

C₇₆H₁₁₀Cl₂N₁₂O₂₁P₂Si₄ (1773,0) Ber. C 51,49 H 6,25 N 9,48% Gef. C 51,44 H 6,36 N 9,39%

2.11. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^p-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^p-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2',3'-O-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin (**27**). Verbindung **5** (0,092 g, 0,1 mmol), 0,126 g (0,1 mmol) **15** [8] und 0,06 g (0,2 mmol) MS-NI werden in 2 ml Pyridin gelöst und 4 Tage bei RT. gerührt. Man löst in 100 ml, schüttelt 3mal mit je 100 ml Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na₂SO₄), engt ein und koevaporiert noch 2mal mit je 40 ml Benzol. Der Rückstand wird über eine handgestopfte Kieselgelsäule (2,5 × 10 cm) mit CH₂Cl₂/AcOEt (1:1) vorchromatographiert. Die Hauptfraktion wird gesammelt, eingeengt und zur weiteren Reinigung durch präp. Mitteldruckchromatographie über eine GFS-Säule, Typ C (N = 5900), mit CH₂Cl₂/Petroläther/MeOH (50:50:1) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 35 ml/Min. chromatographiert. Das Produkt wird mit einer t_R von 1 Std. eluiert und ergibt nach Einengen dieser Fraktion, Lösen in wenig CH₂Cl₂ und Eintropfen in Hexan unter Rühren 0,154 g (75%) farbloses Pulver.

C₉₉H₁₂₄Cl₂N₁₂O₂₁P₂Si₄ (2063,4) Ber. C 57,63 H 6,06 N 8,15% Gef. C 57,52 H 6,08 N 7,99%

2.12. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^p-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^p-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2',3'-O-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin (**28**). Verbindung **27** (0,413 g, 0,2 mmol) wird in 2,5 ml einer kalten 2proz. Lösung von TsOH in CH₂Cl₂/MeOH (4:1) gelöst und 4 Std. bei –10° aufbewahrt. Man verdünnt dann mit 200 ml CHCl₃, schüttelt 3mal mit je 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na₂SO₄) und engt ein. Der Rückstand wird über eine handgepackte Kieselgelsäule (1 × 15 cm) mit 250 ml CH₂Cl₂ und dann 750 ml CH₂Cl₂/MeOH (95:5) vorchromatographiert. Nach Einengen der Produktfraktion wird weiter durch präp. Mitteldruckchromatographie über eine GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N = 7000), mit CH₂Cl₂/Petroläther/MeOH (50:50:3) chromatographiert. Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 31 ml/Min. erscheint das Produkt mit einer t_R von 42 Min. Man sammelt diese Fraktion, engt ein, löst den Rückstand in wenig CH₂Cl₂ und tropft unter Rühren in 200 ml Hexan ein, wobei 0,349 g (97%) farbloses Pulver anfällt.

C₇₉H₁₀₈Cl₂N₁₂O₂₀P₂Si₄ (1791,0) Ber. C 52,98 H 6,08 N 9,38% Gef. C 52,98 H 6,15 N 9,20%

2.13. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^p-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^p-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)guanosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat (**29**). Verbindung **22** (0,283 g, 0,18 mmol), 0,107 g (0,15 mmol) **12** [7] und 0,14 g (0,36 mmol) TPS-NT werden 1 Tag bei 50°/10⁻³ Torr getrocknet, dann in 4 ml abs. Pyridin gelöst und anschließend 24 Std. bei 5° gerührt. Man nimmt das Gemisch in 200 ml CHCl₃ auf, schüttelt 3mal mit je 200 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na₂SO₄), engt ein und koevaporiert noch 3mal mit je 50 ml Toluol. Der bräunliche ölige Rückstand wird über eine Kieselgelsäule (2 × 10 cm) mit 400 ml CH₂Cl₂ und 1,21 CH₂Cl₂/MeOH vorchromatographiert, wobei das Produkt gegen Ende eluiert wird. Die Produktfraktion wird eingeengt und dann über eine GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N = 7000), mit CH₂Cl₂/MeOH (98:2) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 28 ml/Min. chromatographiert. Das Produkt wird mit einer t_R von 30 Min. eluiert und zeigt nach Einengen im Chromatogramm noch eine kleine Menge an Ausgangsprodukt **12** an. Die Mitteldruckchromatographie wird daher mit CH₂Cl₂/Petroläther/MeOH (100:200:15–24) wiederholt und liefert nach Einengen der Produktfraktion, Lösen in CH₂Cl₂ und Eintropfen in Hexan unter Rühren 0,26 g (80%) farbloses Pulver.

C₉₉H₁₁₉Cl₃N₁₃O₂₅P₃Si₃ (2174,7) Ber. C 54,68 H 5,52 N 8,37% Gef. C 54,69 H 5,47 N 8,41%

2.14. Triäthylammonium-[2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^p-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^p-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)guanosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] (**30**). Verbindung **29** (0,218 g, 0,1 mmol) wird in 3 ml abs. Pyridin und 3 ml abs. Et₃N 8 Std. bei RT. gerührt. Man engt ein, koevaporiert mit je 50 ml eines Gemisches Pyridin/Toluol (1:1) und anschließend noch 3mal mit je 30 ml Toluol, wobei ein fester Schaum hinterbleibt. Man chromatographiert über eine handgepackte Kieselgelsäule (1 × 10 cm) mit 250 ml CH₂Cl₂/AcOEt (1:1) und 750 ml CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N (20:1:1). Die Produktfraktion, die gegen Ende eluiert wird, gibt beim Einengen einen festen Rückstand, der in wenig CH₂Cl₂ gelöst und unter Rühren in 400 ml Hexan langsam eingetropft wird. Der flockige Niederschlag wird gesammelt, eine Woche bei 50°/10⁻³ Torr über P₄O₁₀/Paraffin getrocknet und ergibt 0,201 g (90%) farbloses Pulver. Die Substanz wird durch Aufnahme ihres UV-Spektrums, das nahezu identisch ist mit dem der analysenreinen Ausgangssubstanz **29** (Tabelle), charakterisiert.

2.15. 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-N²-isobutyryl-5'-O-(4-methoxytrityl)guanosyl-[3'-[O^p-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(*tert*-butyldimethyl-

silyl]-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2',3'-O-bis(tert-butylidimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)guanosin (**31**). Triäthylammonium-[2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)-5'-O-(4-methoxytrityl)guanosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)guanosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] (**23**; 0,05 g, 0,03 mmol) [1], 0,044 g (0,025 mmol) **26** und 0,023 g (0,06 mmol) TPS-NT werden nach 4 Std. Trocknen bei 50°/10⁻³ Torr in 2 ml abs. Pyridin gelöst und dann 1 Tag bei 5° gerührt. Man verdünnt das Gemisch mit 200 ml CHCl₃, schüttelt 3mal mit je 200 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na₂SO₄), rotiert ein und koevaporiert noch mehrfach mit Toluol. Der bräunliche Rückstand wird über eine handgepackte Kieselgelsäule (1 × 20 cm) mit 300 ml CH₂Cl₂ und 1 l CH₂Cl₂/MeOH (98:2) vorchromatographiert, wobei die Produktfraktion gegen Ende eluiert wird. Man engt ein und erhält 80 mg festen Schaum, der im DC neben dem Produkt nur noch geringe Mengen an **26** enthält. Man reinigt weiter durch präp. Mitteldruckchromatographie über eine GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N = 7000) mit CCl₄/CH₂Cl₂/MeOH (25:25:1) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 36 ml/Min. Der Produkt-Peak erscheint mit einer t_R von 180 Min. Man sammelt diese Fraktion und engt sehr vorsichtig i. V. ein. Da hierbei unerklärlicherweise etwas Zersetzung eintrat, wird das Produkt nochmals über eine handgepackte Kieselgelsäule (1 × 15 cm) mit CH₂Cl₂/MeOH (97:7) chromatographiert und hierbei ein DC-reines Material gewonnen. Nach Einengen der Produktfraktion wird in wenig CH₂Cl₂ gelöst und unter Rühren in 100 ml Hexan eingetropfelt, wobei sich 39 mg (48%) farbloses Pulver abscheidet.

2.16. 2'-O-(tert-Butylidimethylsilyl)-5'-O-(4-methoxytrityl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)guanosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin (**32**). Verbindung **30** (0,193 g, 0,087 mmol), 0,143 g (0,08 mmol) **28** und 0,066 g (0,17 mmol) TPS-NT werden 10 Std. bei 50°/10⁻³ Torr getrocknet und dann nach Lösen in 3 ml abs. Pyridin bei 5° 40 Std. gerührt. Man verdünnt das Gemisch mit 200 ml CHCl₃, schüttelt 3mal mit 200 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na₂SO₄), rotiert ein und koevaporiert mehrmals mit Toluol. Der bräunliche Rückstand wird über eine handgepackte Kieselgelsäule (1 × 20 cm) mit 300 ml CH₂Cl₂ und anschließend 900 ml CH₂Cl₂/MeOH (97:3) chromatographiert, wobei sich das Produkt in der zweiten Hälfte der Elutionsmenge befindet. Man engt erneut ein und reinigt über eine präparative GFS-Säule, Typ C (N = 12000), mit CH₂Cl₂/MeOH/PrOH (100:1:3), wobei **32** nach unumgesetztem **28** als zweite Fraktion eluiert wird. Da die Produktfraktion nach Einengen noch leicht gelblich gefärbt war, wurde die Mitteldruckchromatographie über eine B-Säule (N = 7000), mit CH₂Cl₂/MeOH (50:1) mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 28 ml/Min. wiederholt und das Produkt, das eine t_R von 31 Min. zeigt, gesammelt. Nach Einengen löst man den Rückstand in wenig CH₂Cl₂ und tropft unter Rühren in 200 ml Hexan ein. Es werden 0,238 g (76%) farbloses Pulver erhalten.

C₁₇₅H₂₂₂Cl₅N₂₄O₄₄P₅Si₇ (3894,6) Ber. C 53,97 H 5,75 N 8,63% Gef. C 53,88 H 5,75 N 8,56%

2.17. 2'-O-(tert-Butylidimethylsilyl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)guanosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosin (**33**). Verbindung **32** (0,203 g, 0,052 mmol) wird in 0,9 ml einer Lösung von 2 g TsOH in 100 ml CH₂Cl₂/MeOH (4:1) 24 Std. bei -18° behandelt. Man verdünnt das Gemisch mit 200 ml CHCl₃, schüttelt 3mal mit je 200 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na₂SO₄) und engt ein. Der Rückstand wird über eine präp. GFS-Kieselgelsäule, Typ B (N = 7000), mit CH₂Cl₂/Petroläther/MeOH (100:10:1,55-3,2) und einem Gesamtvolumen von 4,5 l chromatographiert. Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 30 ml/Min. beträgt t_R des Produktes 90 Min. Die Produktfraktion wird eingengt, der Rückstand in wenig CH₂Cl₂ gelöst und durch Eintropfen in 200 ml Hexan unter Rühren ausgefällt. Der flockige Niederschlag wird abgesaugt und getrocknet und liefert 0,153 g (81%) farbloses Pulver.

C₁₅₅H₂₀₆Cl₅N₂₄O₄₃P₅Si₇ (3622,3) Ber. C 51,40 H 5,73 N 9,28% Gef. C 51,58 H 5,72 N 9,12%

2.18. 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']-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-N²-(isobutyryl)guanosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5,6-dihydrouridyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)adenosyl-[3'-[O^P-(2-chlorphenyl)]-5']-N⁶-benzoyl-2',3'-O-bis(tert-butylidimethylsilyl)adenosin (**34**). Triäthylammonium-[N⁶-

benzoyl-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-*O*-(4-methoxytrityl)adenosyl-[3'-[*O*^{*P*}-(2-chlorphenyl)]-5']-*N*⁶-benzoyl-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)adenosin-3'-(2-chlorphenyl)phosphat] (**24**; 0,07 g, 0,041 mmol) [8], 0,132 g (0,036 mmol) **33** und 0,031 g (0,082 mmol) TPS-NT werden nach 6 Std. Trocknen bei 50°/10⁻³ Torr in 3 ml abs. Pyridin gelöst und 20 Std. bei 5° gerührt. Man verdünnt das Gemisch mit 200 ml CHCl₃, schüttelt 3mal mit je 200 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 aus, trocknet die org. Phase (Na₂SO₄), rotiert ein und koevaporiert noch mehrmals mit Toluol. Der bräunliche Rückstand wird über eine handgepackte Kieselgelsäule (1 × 20 cm) mit 1 l CH₂Cl₂/MeOH (2000:3) und 1,5 l CH₂Cl₂/MeOH (100:3) vorchromatographiert, wobei das Produkt sich im letzten Liter Eluat befindet. Man engt ein und reinigt weiter durch Mitteldruckchromatographie über eine GFS-Kieselgelsäule, Typ B (*N* = 7000), mit CH₂Cl₂/Petroläther/MeOH (100:10:2–2,5) in einem Gesamtvolumen von 3 l. Bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 29 ml/Min. erscheint der Produkt-Peak mit einer *t*_R von 36 Min. Man sammelt die Hauptfraktion, engt ein, löst den Rückstand in wenig CH₂Cl₂ und tropft unter Rühren in 200 ml Hexan ein, wobei sich ein flockiger Niederschlag abscheidet. Das Produkt wird gesammelt, bei 50°/10⁻³ Torr getrocknet und liefert 0,15 g (79%) farbloses Pulver.

C₂₃₃H₂₈₈Cl₇N₃₄O₅₈P₇Si₉ (5210,9) Ber. C 53,71 H 5,57 N 9,14% Gef. C 53,81 H 5,47 N 9,30%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] XX. Mitteilung: *M. Hattori und W. Pfeleiderer*, Pharm. Chem. Bull. im Druck (1983).
- [2] *D. H. Gauss & M. Sprinzl*, Nucleic Acids Res. 9, r1 (1981).
- [3] *J. Smrt*, Collect. Czech. Chem. Commun. 32, 198 (1967).
- [4] *J. Smrt*, Collect. Czech. Chem. Commun. 33, 2470 (1968).
- [5] *J. Smrt*, Collect. Czech. Chem. Commun. 34, 1702 (1969).
- [6] *D. Flockerzi, G. Silber, R. Charubala, W. Schlosser, R.S. Varma, F. Creegan & W. Pfeleiderer*, Justus Liebigs Ann. Chem. 1981, 1568.
- [7] *G. Silber, D. Flockerzi, R.S. Varma, R. Charubala, E. Uhlmann & W. Pfeleiderer*, Helv. Chim. Acta 64, 1704 (1981).
- [8] *D. Flockerzi, E. Uhlmann & W. Pfeleiderer*, Helv. Chim. Acta 66, 2018 (1983).
- [9] Prof. Dr. *G. Helmchen*, Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart, *D. Flockerzi*, Diplomarbeit Univ. Stuttgart 1977.
- [10] *C. B. Reese, R.C. Titmas & I. Yau*, Tetrahedron Lett. 1978, 2727; *C. B. Reese & L. Zard*, Nucleic Acids Res. 9, 4611 (1981).
- [11] *D. Flockerzi, W. Schlosser & W. Pfeleiderer*, Helv. Chim. Acta 66, 2069 (1983).