

53. Nucleoside und Nucleotide<sup>1)</sup>

Teil 22

## Synthese eines Tridecanucleosiddodecaphosphats, das die unnatürliche Base 2(1H)-Pyrimidinon enthält

von Rolf Altermatt und Christoph Tamm\*

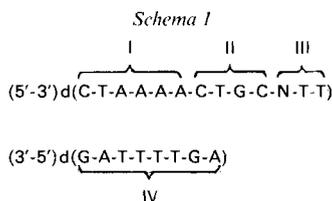
Institut für Organische Chemie der Universität, St. Johannis-Ring 19, CH-4056 Basel

(27.XII.84)

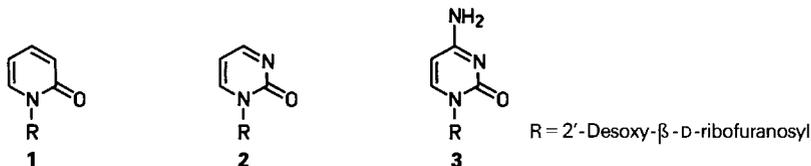
## Nucleosides and Nucleotides. Part 22. Synthesis of a Tridecanucleoside Dodecaphosphate Containing the Unnatural Base 2(1H)-Pyrimidinone

The tridecanucleosid dodecaphosphate d(TpTpMpCpGpTpCpApApApApTpC) incorporating the modified nucleoside 1-(2'-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinone ( $M_d$ , **2**) was synthesized using the triester method. The intermediates were the suitably protected trimer d(TpTpM) and the pentamer d(TpTpMpCpG). The latter was condensed with the protected octamer d(TpCpApApApApTpC) to yield the desired tridecanucleotide.

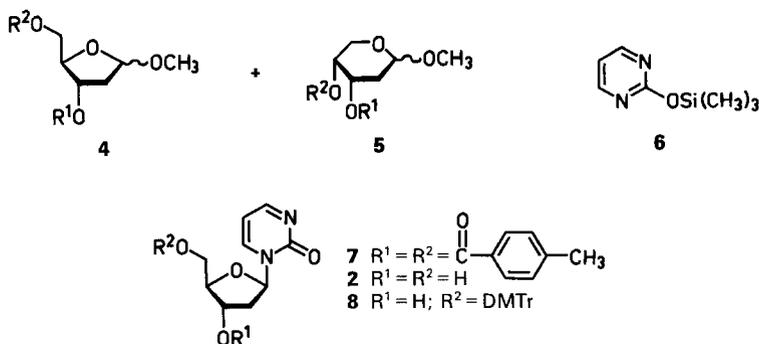
**1. Einleitung.** – Unser Konzept zur Untersuchung der Spezifität der DNA-Polymerase basiert auf der Kombination eines 'Primer'-Stranges mit einem 'Template'-Strang (*Schema 1*), der an einer definierten Stelle N eine Base enthält, die nicht oder nur beschränkt zur Ausbildung von H-Brücken nach dem Prinzip von *Watson* und *Crick* [2] befähigt ist [3].



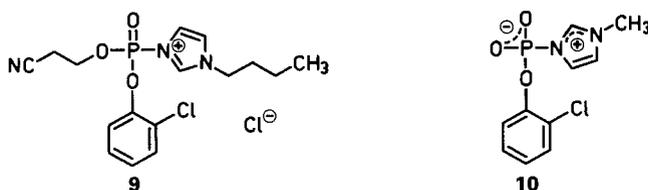
Der Primer-Strang IV ist vor einiger Zeit von *Bühlmayer et al.* [4] hergestellt worden. Nachdem wir vor kurzem auch über die Synthese des der DNA-Matrize entsprechenden Tridecanucleosid-dodecaphosphats, welches das 2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofid (**1**) mit der Fremdbase 2(1H)-Pyridinon an der mit N bezeichneten Stelle besitzt, berichtet haben,

<sup>1)</sup> Teil 21: [1].





führt nur das Furanosid nicht aber das Pyranosid in das reaktive Kation über, welches anschliessend mit der nucleophilen Base **6** reagiert [9]. Das resultierende Anomerengemisch liess sich nur durch Chromatographie an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  trennen. Die Ausbeute an gewünschtem reinem ditoluoyliertem  $\beta$ -Nucleosid **7** betrug 30%. Abspaltung der Schutzgruppen mit  $\text{NaOMe}$  in  $\text{MeOH}$  ergab das freie Nucleosid **2**, dessen 5'-OH-Gruppe durch Behandeln mit 1,5-Mol-Äquiv. Dimethoxytritylchlorid geschützt wurde. Zur anschliessenden Einführung einer geschützten Phosphatgruppe im erhaltenen Derivat  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]M_d$  (**8**) diente (2-Chlorphenyl)-(2-cyanoäthyl)-phosphochloridat/*N*-Butylimidazol [10]. Durch Modifikation des Verfahrens (Lösung des Nucleosids zuerst mit dem *N*-Alkylimidazol und dann mit dem Phosphorylierungsmittel versetzt) liess sich die Ausbeute an  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]M_d\phi(\text{CNEt})$  wesentlich steigern. Vermutlich reagiert dann der Phosphorchloridsäure-diester zuerst mit dem Alkylimidazol unter Bildung von **9**. Derartige Zwischenprodukte postulieren auch *Chabrier et al.* [11] bei der Synthese von Phosphorimidazolium-Derivaten. Durch Reaktion des Phosphorylierungsmittels mit *N*-Alkylimidazolen können sich zwitterionische Nebenprodukte bilden, wie wir anhand der Reaktion in Abwesenheit eines Nucleotids mit freier OH-Gruppe aufgrund der IR- und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren feststellen konnten. Mit *N*-Methylimidazol wird so das Zwitterion **10**



erhalten. Die Abspaltung der Dimethoxytrityl-Schutzgruppe in  $(\text{DMTr})M_d\phi(\text{CE})$  bereitet wegen der Säurelabilität der *N*-glycosidischen Bindung Schwierigkeiten. Nach vielen Versuchen erwies sich die von *Waldmeier et al.* [12] entwickelte Methode mit  $\text{ZnBr}_2/4$ -(*tert*-Butyl)pyridin am besten.  $M_d\phi(\text{CNEt})$  wurde aus  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]M_d\phi(\text{CNEt})$  in 95% Ausbeute erhalten. Für die selektive Entfernung der ( $\beta$ -Cyanoäthyl)-Gruppe bewährte sich die Behandlung mit  $\text{Et}_3\text{N}/\text{abs. Pyridin}$  oder  $\text{Et}_3\text{N}/\text{H}_2\text{O}/\text{Pyridin}$  [13] und für die vollständige Abspaltung der Schutzgruppen wurde am besten zuerst mit dem Benzaldoximat-Reagens [14] (spaltet die (2-Chlorphenyl)-Gruppe ab), dann mit  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$  und schliesslich mit  $\text{HCOOH}/\text{MeOH}$  behandelt.

**3. Synthese von  $d(TpTpMpCpGpTpCpApApApApTpC)$ .** – Als erstes galt es, das geschützte Trimere  $[(MeO)_2Tr]T_d\phi T_d\phi M_d\phi(CNEt)$  bereitzustellen. Da die Monomethoxytritylgruppe stabiler als die Dimethoxytritylgruppe ist, wurde zuerst  $(MeOTr)T_d\phi T_d\phi M_d\phi(CNEt)$  durch Kondensation des Dinucleotids  $(MeOTr)T_d\phi T_d\phi^\ominus$  (gewonnen aus  $(MeOTr)T_d\phi T_d\phi(CNEt)$  durch Behandeln mit  $Et_3N$  und abs. Pyridin) mit  $M_d\phi(CNEt)$  hergestellt. Als Kondensationsmittel diente  $TPSCl^2$  oder 1-(2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol (TPSNT). Im Verlaufe der weiteren Synthese zeigte sich aber, dass die vollständige Entfernung des Monomethoxytritylrests sehr

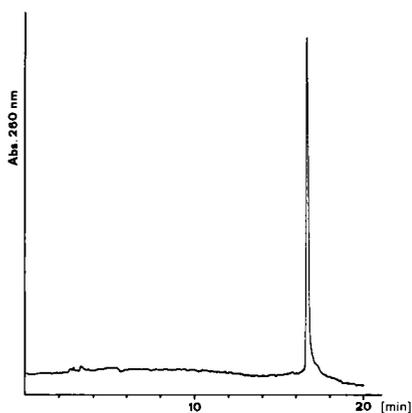


Fig. 1. HPLC-Reinigung von  $d(TpTpMpCpGpTpCpApApApApTpC)$  ( $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$ )

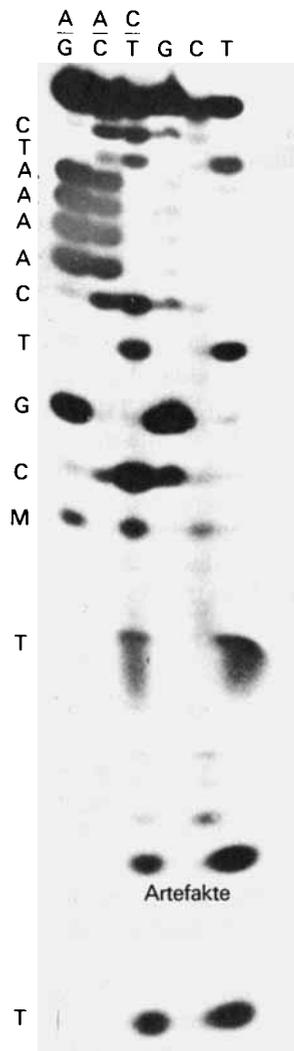


Fig. 2. Sequenzanalyse von  $d(TpTpMpCpGpTpCpApApApApTpC)$

schwierig ist. Deshalb wurde auf die Dimethoxytritylgruppe zurückgegriffen. Zur Kondensation von  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{T}_d\phi\text{T}_d\phi^\ominus$  mit  $\text{M}_d\phi(\text{CNEt})$  diente TPSNT. Die Reinigung des erhaltenen Trinucleotids  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{T}_d\phi\text{T}_d\phi\text{M}_d\phi(\text{CNEt})$  erfolgte durch 'reversed-phase'-Chromatographie an silanisiertem Kieselgel. Die Ausbeute betrug 92%. Zur weiteren Charakterisierung des Produkts wurden die Schutzgruppen vollständig entfernt. Das resultierende Trinucleotid  $\text{T}_d\text{pT}_d\text{pM}_d\phi^\ominus$  war aufgrund der Ionenaustaucher-HPLC-Analyse intakt. Das Präparat enthielt nur sehr geringe Verunreinigungen.

Der nächste Schritt bestand in der Synthese des geschützten Pentanucleotids  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{T}_d\phi\text{T}_d\phi\text{M}_d\phi^{\text{an}}\text{C}_d\phi^{\text{ib}}\text{G}_d\phi(\text{CNEt})$  durch Kondensation von  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{T}_d\phi\text{T}_d\phi\text{M}_d\phi$  mit  $^{\text{an}}\text{C}_d\phi^{\text{ib}}\text{G}_d\phi(\text{CNEt})$  in Gegenwart von TPSNT. Die trimere Komponente wurde aus dem entsprechenden Cyanoäthyl-geschützten Derivat durch Abspaltung der Schutzgruppe mit  $\text{Et}_3\text{N}/\text{abs. Pyridin}$  erhalten. Reinigung des Kondensationsprodukts durch Chromatographie an silanisiertem Kieselgel mit einem  $\text{H}_2\text{O}/\text{Aceton}$ -Gradienten ergab das gewünschte Pentamere in 74% Ausbeute. Zur Charakterisierung wurden wieder die weiteren Schutzgruppen entfernt. Das resultierende Pentanucleotid  $\text{T}_d\text{pT}_d\text{pM}_d\text{pC}_d\text{pG}_d\phi^\ominus$  war nach der Ionenaustauscher-HPLC-Analyse praktisch rein.

Für die weitere Kondensation des teilweise geschützten Pentanucleotids mit dem Octanucleosid-heptaphosphat  $\text{T}_d\phi^{\text{an}}\text{C}_d\phi^{\text{bz}}\text{A}_d\phi^{\text{bz}}\text{A}_d\phi^{\text{bz}}\text{A}_d\phi^{\text{bz}}\text{A}_d\phi\text{T}_d\phi^{\text{an}}\text{C}(\text{Bz})$  wurde zuerst die CNEt-Gruppe mit  $\text{Et}_3\text{N}/\text{Pyridin}$  entfernt und die anschließende Kupplungsreaktion in Gegenwart von 15 Mol-Äquiv. TPSNT vorgenommen. Nach 6 h betrug die Ausbeute an vollgeschütztem Tridecanucleosid-dodecaphosphat nur 40%. Sie liess sich weder durch eine längere Reaktionszeit noch durch Verwendung von  $\text{TPSCl}/1\text{-Methylimidazol}$  als Kondensationsmittel erhöhen. Die vollständige Abspaltung der Schutzgruppen wurde wie oben beschrieben vorgenommen und führte zum gewünschten Endprodukt  $\text{d}(\text{TpTpMpCpGpTpCpApApApApTpC})$ . Da das Präparat nach der Analyse mit Anionenaustauscher-HPLC auf einer *Partisil SAX*-Säule noch ungeschütztes Octanucleotid enthielt, wurde mit der gleichen Anordnung eine präparative Trennung vorgenommen. Die lyophilisierten Fraktionen wurden von den vom Salzgradienten stammenden nichtflüchtigen Anteilen mittels 'reversed-phase'-Chromatographie auf einer  $\mu\text{-Bondapak-C}_{18}$ -HPLC-Säule befreit (Fig. 1). Der enzymatische Abbau mit Phosphodiesterase I aus Schlangengift (30 min, 37°) bestätigte das Basenverhältnis im erhaltenen einheitlichen Tridecameren. Das Verhältnis der erhaltenen Monomeren betrug wie erwartet  $\text{pA}/\text{pC}/\text{pG}/\text{pM}/\text{pT}/\text{T} = 4:3:1:1:3:1$ . Die monomeren Spaltprodukte wurden mittels HPLC auf *Partisil SAX* getrennt, durch Vergleich mit Referenzsubstanzen zugeordnet und quantitativ bestimmt.

Eine nach der Methode von *Maxam* und *Gilbert* [15] vorgenommene Sequenzanalyse<sup>3)</sup> bestätigte die korrekte Reihenfolge der Basen (Fig. 2).

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

<sup>3)</sup> Wir danken Herrn Prof. *T. A. Bickle*, Abteilung Mikrobiologie des Biozentrums der Universität Basel, bestens für die Durchführung der Analyse.

## Experimenteller Teil

*Allgemeines.* S. [1], ausser den folgenden Änderungen und Ergänzungen: Hexamethyldisilazan und Trifluormethansulfonsäure-(trimethylsilyl)ester wurden von der *Fluka AG.*, Buchs SG, bezogen. Phosphodiesterase I aus Schlangengift (*E.C.3.1.4.1*) stammte von *P. L. Biochemicals Inc.*, Milwaukee, U.S.A. MeOH, Toluol und Aceton 'Baker Analysed Reagent' wurden von *J. T. Baker, Chemicals B. V.*, Deventer, Holland, erhalten. Für die Triestersynthese des Tridecanucleosid-dodecaphosphats wurden von Herrn Dr. *S. De Bernardini* die Oligonucleotide [(MeO)<sub>2</sub>Tr]T $\phi$ T $\phi$ (CNEt), <sup>14</sup>C $\phi$ <sup>18</sup>G $\phi$ (CNEt) und das Octamere zur Verfügung gestellt. Die Ausbeuten wurden, falls nicht anders erwähnt, gravimetrisch bestimmt. Für die Ionenaustauscher- und Gelchromatographie wurde *DEAE-Sephadex-A25-* resp. *Sephadex-G*-Typen von *Pharmacia Fine Chemicals*, Uppsala, Schweden, verwendet. Für die konventionelle Säulenchromatographie wurden Kieselgel 60 (0,063–0,200 mm) und Aluminiumoxid 90 (0,063–0,200 mm, standardisiert, Akt. II–III nach *Brockmann*), für die 'short-column'-Chromatographie Kieselgel 60 (0,040–0,063 mm) und für die 'reversed-phase'-Chromatographie silanisierteres *RP-2*-Kieselgel 60 (0,063–0,200 mm), alle von *Merck*, Darmstadt, BRD, verwendet. Für die HPLC wurden die anal. Säulen *Partisil PXS 10/25 SAX* (10  $\mu$ m, 250  $\times$  4,6 mm) von *Whatmann*, New Jersey, U.S.A.,  $\mu$ -*Bondapak C<sub>18</sub>* (10  $\mu$ m, 300  $\times$  3,9 mm) von *Waters*, Milford, U.S.A., und eine Kieselgelsäure von *Knauer*, Berlin, gefüllt mit *Lichrosorb Si 60* (7  $\mu$ m, 250  $\times$  4,6 mm), eingesetzt. Als HPLC-Eluenten wurden verwendet: I: linearer Gradient von 0,001M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,6) bis 0,4M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,6) je in einer Lsg. von 10proz. Formamid in H<sub>2</sub>O, während 30 min; II: 0,05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O (pH 3,3); III: linearer Gradient von MeCN/O<sub>2</sub>, 1M NH<sub>4</sub>OAc (pH 7,0) 5:95 bis MeCN/O<sub>2</sub>, 1M NH<sub>4</sub>OAc (pH 7,0) 20:80, während 15 min. Die *Partisil*-Ionenaustauschersäule wurde mittels einer dazu erhältlichen Vorsäule ('Survival Kit', *Whatman*) vor allzu rascher Zerstörung geschützt.

1-[2'-Desoxy-3',5'-di-O-(*p*-toluoyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl]-2(1H)-pyrimidinon (**7**). In Gegenwart einer Spatelspitze (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurden 750 mg (5,6 mmol) 2-Hydroxypyrimidin-hydrochlorid mit 2 ml (10 mmol) Hexamethyldisilazan versetzt und 2 h unter Rückfluss gerührt. Das überschüssige Silylierungsmittel wurde i.HV. unter Zusatz von abs. Xylol entfernt. Das flüssige Rohprodukt wurde direkt ohne weitere Reinigung weiterverwendet.

Zu einer Lsg. von 382 mg (1 mmol) des nach [8] hergestellten Gemischs aus Methyl-2-desoxy-3,5-di-O-(*p*-toluoyl)-D-ribofuranosid und dem entsprechenden Pyranosid in 6 ml abs. MeCN wurden 150  $\mu$ l (1,2 mmol) silyliertes 2-Hydroxypyrimidin gegeben, was zu einem flockigen Niederschlag führte. Das Zutropfen von 245  $\mu$ l (1,4 mmol) Trifluormethansulfonsäure-(trimethylsilyl)ester ergab eine klare, gelbliche Lsg. Diese wurde 3 h bei 20° gerührt. Dann entfernte man das Lsgm. i. V. und arbeitete durch Ausschütteln mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> auf. Nach Trocknen der org. Phase mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abdampfen wurde ein Anomerengemisch als farbloser Schaum erhalten. Dieses wurde an Aluminiumoxid (neutral) mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O 7:3 mit abnehmendem Et<sub>2</sub>O-Gehalt und einem EtOH-Gradienten getrennt. Aus den Fraktionen 12–19 (je 20 ml, 2% EtOH) liess sich **7** (137 mg, 30%) gewinnen. Chromatographische und spektroskopische Daten stimmten mit denjenigen einer Referenzsubstanz [5] überein.

1-(2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon (M<sub>d</sub>, **2**). Zu einer Lsg. von 950 mg (2,12 mmol) **7** in 50 ml abs. MeOH wurden 28,5 ml 0,2M NaOMe-Lsg. gegeben. Nach 10 min war im DC kein **7** mehr sichtbar. Nach 20 min neutralisierte man mit Pyridinium-*Dowex*. Der Ionenaustauscher wurde über eine Säule abfiltriert und mit 300 ml MeOH gewaschen. Dann wurde das MeOH i. RV. entfernt. Den lackartigen Rückstand löste man in wenig MeOH und chromatographierte ihn über eine mit 70 g silanisierendem Kieselgel gepackte Säule mit H<sub>2</sub>O (Fraktionen von 20 ml). Die Fraktionen 9–11 ergaben 331 mg (74%) **2**. Das Produkt war im DC einheitlich und stimmte in den R<sub>F</sub>-Werten sowie allen spektroskopischen Daten mit einer Referenzsubstanz [5] überein.

1-(2'-Desoxy-5'-O-dimethoxytrityl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon [(MeO)<sub>2</sub>Tr]M<sub>d</sub>, **8**). Eine Lsg. von 733 mg (3,45 mmol) **2** in 10 ml abs. Pyridin wurde mit 1,75 g (5,2 mmol) (MeO)<sub>2</sub>TrCl versetzt. Nach 30 min Rühren gab man 6 ml MeOH hinzu. Die Lsg. wurde 20 min später i. V. eingeeengt und das Pyridin durch mehrmaliges Zugabe von Toluol azeotrop entfernt. Dann nahm man den Rückstand in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> auf und extrahierte mit 30 ml 2proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung. Die org. Phase wurde mit H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und i. V. eingedampft. Der Rückstand wurde nach Lösen in wenig CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> über eine mit 200 g Kieselgel gepackte Säule mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und zunehmendem Anteil MeOH chromatographiert. Bei einem MeOH-Gehalt von 4–5% wurden 1,614 g (91%) nach HPLC und DC reines **8** gewonnen. UV (MeOH): max. 310, 234; min. 260.

1-(2'-Desoxy-5'-O-dimethoxytrityl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon-3'-[(2-chlorphenyl)-(2-cyanoäthyl)-phosphat] [(MeO)<sub>2</sub>Tr]M<sub>d</sub>(CNEt). Im HV. wurden 991 mg (1,92 mmol) [(MeO)<sub>2</sub>Tr]M<sub>d</sub> durch 2maliges Abdampfen von abs. Pyridin getrocknet. Zum unter Ar stehenden Rückstand gab man 8 ml Pyridin und 750  $\mu$ l (5,8 mmol) *N*-Butylimidazol und kühlte auf 0°. Nach 5 min wurden 1,2 ml (5,2 mmol) (2-Chlorphenyl)-(2-cyanoäthyl)-phosphochlorid zugegeben. Nach 50 min war im DC kein Edukt mehr sichtbar. Es erfolgte Hydrolyse durch Zugabe von 1 g Eis. Nach 10 min wurde i. V. eingeeengt und das Pyridin durch Zugabe von Toluol und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

azeotrop entfernt. Darauf nahm man in 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 100 ml 2,5proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. auf und extrahierte 3mal mit je 100 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Die org. Phasen wurden vereinigt, getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und eingedampft. Man nahm den Rückstand in 4 ml AcOEt auf und fällte 2mal aus je 1 l Petroläther. Der Niederschlag wurde abfiltriert, in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und über eine Kieselgelsäule mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, welches steigende Mengen MeOH enthielt, chromatographiert. Das Produkt wurde bei 3% MeOH-Gehalt in einer Ausbeute von 76% gewonnen. Die HPLC-Analyse auf Kieselgel zeigte nur die den beiden Diastereomeren entsprechenden Spitzen. Im DC war nur 1 Fleck sichtbar. UV (MeOH): max. 309, 233.

*2-Desoxy-β-D-ribofuranosyl-2(1H)-pyrimidinon-3'-[(2-chlorphenyl)-(2-cyanoäthyl)-phosphat] (M<sub>dφ</sub>(CNEt).* Mit einer Lsg. von 6,2 g ZnBr<sub>2</sub> in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, welches 15% i-PrOH enthielt, wurden 420 mg (0,55 mmol) [(MeO)<sub>2</sub>Tr]<sub>dφ</sub>(CNEt) versetzt. Nach 10 min komplexierte man das ZnBr<sub>2</sub> in der klaren, orangen Lsg. unter Eiskühlung mit 8,5 ml 4-(*tert*-Butyl)pyridin, wobei sich die Lsg. entfärbte. Diese wurde eingedampft, der Rückstand in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen und auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. Mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurde der Bis[4-(*tert*-butyl)pyridin]zinkbromid-Komplex ausgewaschen, dann wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, welches steigende Mengen MeOH enthielt, eluiert. Das Produkt (232 mg, 95%) erschien bei 7–10% MeOH-Gehalt. Die Substanz war im DC einheitlich. UV(MeOH): max. 309; min. 245; sh 274, 267 nm.

[(MeO)<sub>2</sub>Tr]<sub>dφ</sub>T<sub>dφ</sub>M<sub>dφ</sub>(CNEt). Bei 25° wurden 433 mg (0,36 mmol) [(MeO)<sub>2</sub>Tr]<sub>dφ</sub>T<sub>dφ</sub>(CNEt) mit 15 ml pyridin/H<sub>2</sub>O/Et<sub>3</sub>N 3:1:1 versetzt und 20 min gerührt. Dann dampfte man die klare, gelbliche Lsg. i. HV. (0,1 Torr) ein und trocknete den Rückstand 3mal durch Abdampfen mit je 8 ml abs. Pyridin. Die so erhaltene Diesterkomponente wurde mit 110 mg (0,24 mmol) M<sub>dφ</sub>(CNEt) vereinigt und noch 2mal mit abs. Pyridin getrocknet. Unter Ar erfolgte Zugabe von 5 ml abs. Pyridin und 274 mg (0,72 mmol) TPSNT bei 23°. Nach 40 min wurde mit 5 ml Pyridin/H<sub>2</sub>O 1:1 hydrolysiert. 45 min später entfernte man nacheinander das H<sub>2</sub>O mit Pyridin, dieses mit Toluol und das Toluol mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> azeotrop i. HV. Es resultierte ein gelber Schaum, welcher, in wenig CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst, über eine Kieselgelsäule mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und einem MeOH-Gradienten chromatographiert wurde. Das Produkt wurde bei 5% MeOH eluiert. Da es noch mit etwas M<sub>dφ</sub>(CNEt) verunreinigt war, wurde noch über eine 'reversed-phase'-Säule (mit silanisiertem Kieselgel in Aceton/H<sub>2</sub>O 1:1 gepackt) mit Aceton/H<sub>2</sub>O 1:1 isokratisch chromatographiert (Fraktionen zu 25 ml). Die Verunreinigung erschien in *Frakt. 1* und *2* und das Produkt in *Frakt. 9–11*. Letztere wurden vereinigt und soweit eingeeengt, bis eine farblose Suspension entstanden war. Man extrahierte sie 8mal mit je 30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, trocknete die vereinigten org. Phasen (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und dampfte ein. Der resultierende farblose, spröde Schaum wurde i. HV. getrocknet: 353 mg (92%) Produkt, im DC rein. UV (MeOH): max. 310, 266; sh 234 nm; ε<sub>266</sub>/ε<sub>310</sub> = 3,9.

Eine Probe des Trinucleotids wurde einer vollständigen Schutzgruppenabspaltung unterworfen und das Produkt T<sub>dφ</sub>pT<sub>dφ</sub>pM<sub>dφ</sub><sup>-</sup> mittels HPLC analysiert (vgl. *Fig. 3*; an der endständigen Phosphatgruppe wurde nur die labilere CNEt-Gruppe abgespalten, nicht aber der 2-Chlorphenyl-Rest).

[(MeO)<sub>2</sub>Tr]<sub>dφ</sub>T<sub>dφ</sub>T<sub>dφ</sub>M<sub>dφ</sub>T<sup>an</sup>C<sub>dφ</sub><sup>ib</sup>G<sub>dφ</sub>(CNEt). Die klare, leicht gelbliche Lsg. von 100 mg (63 μmol) [(MeO)<sub>2</sub>Tr]<sub>dφ</sub>T<sub>dφ</sub>T<sub>dφ</sub>M<sub>dφ</sub>(CNEt) in 3 ml abs. Pyridin/Et<sub>3</sub>N 1:1 wurde 2,5 h bei 23° stehengelassen. Man dampfte darauf i. HV. ein, löste noch 3mal mit abs. Pyridin und dampfte erneut ein, um alles Et<sub>3</sub>N und das entstandene

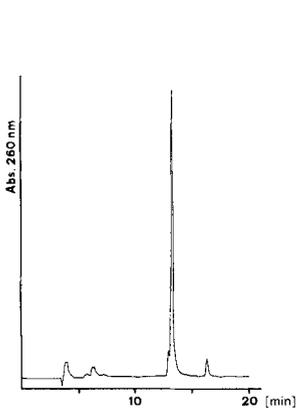


Fig. 3. HPLC des Trinucleotids T<sub>dφ</sub>pT<sub>dφ</sub>pM<sub>dφ</sub><sup>-</sup>

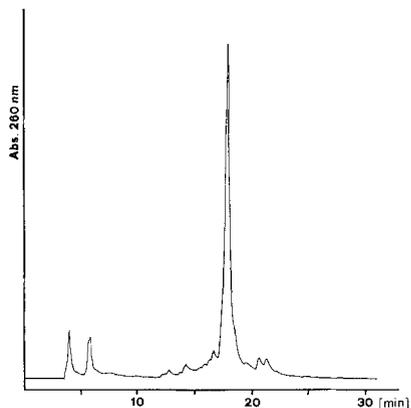


Fig. 4. HPLC des Pentanucleotids T<sub>dφ</sub>pT<sub>dφ</sub>pM<sub>dφ</sub>pC<sub>dφ</sub>pG<sub>dφ</sub><sup>-</sup>

Acrylonitril zu entfernen. Zum Rückstand wurden 47 mg (43  $\mu\text{mol}$ )  $^{\text{an}}\text{C}_d\phi^{\text{ib}}\text{G}_d\phi(\text{CNET})$  gegeben und beide Komponenten wurden 14 h bei 0,1 Torr und getrocknet  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Das Nucleotidgemisch wurde nochmals mit abs. Pyridin versetzt und i. H. eingengt. Nach Ausgleichen des Drucks mit Ar gab man 3,5 ml abs. Pyridin und 96 mg (252  $\mu\text{mol}$ ) TPSNT, ebenfalls über  $\text{P}_2\text{O}_5$  bei 23°/0,1 Torr getrocknet, hinzu. Nach 2,5 h tropfte man 3 ml  $\text{H}_2\text{O}/\text{Pyridin}$  1:1 zu, und 1 h später dampfte man die Lsg. i. HV. vollständig ein.  $\text{H}_2\text{O}$  und Pyridin wurden azeotrop entfernt, wobei ein hellbrauner Schaum zurückblieb. Dieser wurde in 5 ml 30proz.  $\text{H}_2\text{O}/\text{Aceton}$  gelöst und über eine mit silanisiertem Kieselgel gepackte 'reversed-phase'-Säule chromatographiert (Fraktionen zu 8 ml). Man eluierte die polaren Anteile mit 50proz.  $\text{H}_2\text{O}/\text{Aceton}$  in den ersten Fraktionen. Das Produkt (84 mg, 74%) erschien bei 30proz.  $\text{H}_2\text{O}/\text{Aceton}$  in den *Frakt.* 20–24. Die Substanz war im DC einheitlich. UV ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): max. 274, 265, 240 sh 310, 282, 256. Nach Abspalten der Schutzgruppen wurde das Produkt  $\text{T}_d\phi\text{pT}_d\phi\text{M}_d\phi\text{C}_d\phi\text{G}_d\phi^-$  durch HPLC charakterisiert (vgl. *Fig. 4*).

[ $(\text{MeO})_2\text{Tr}$ ] $\text{T}_d\phi\text{T}_d\phi\text{M}_d\phi^{\text{an}}\text{C}_d\phi^{\text{ib}}\text{G}_d\phi\text{T}_d\phi^{\text{an}}\text{C}_d\phi^{\text{bz}}\text{A}_d\phi^{\text{bz}}\text{A}_d\phi^{\text{bz}}\text{A}_d\phi^{\text{bz}}\text{A}_d\phi\text{T}_d\phi^{\text{an}}\text{C}_d$  (*Bz*). Eine Lsg. von 21,3 mg (8.1  $\mu\text{mol}$ ) [ $(\text{MeO})_2\text{Tr}$ ] $\text{T}_d\phi\text{T}_d\phi\text{M}_d\phi^{\text{an}}\text{C}_d\phi^{\text{ib}}\text{G}_d\phi(\text{CNET})$  in 1 ml  $\text{Et}_3\text{N}/\text{Pyridin}$  1:1 wurde 95 min gerührt. Darnach zeigte das DC vollständige Abspaltung der CNET-Gruppe an. Durch mehrmaliges Abdampfen von abs. Pyridin i. HV. wurden das  $\text{Et}_3\text{N}$  und das entstandene Acrylonitril entfernt. Der Rückstand wurde 24 h über  $\text{P}_2\text{O}_5$  i. HV. getrocknet. Auf dieselbe Weise trocknete man 21,5 mg (5,4  $\mu\text{mol}$ )  $\text{T}_d\phi^{\text{an}}\text{C}_d\phi^{\text{bz}}\text{A}_d\phi^{\text{bz}}\text{A}_d\phi^{\text{bz}}\text{A}_d\phi\text{T}_d\phi^{\text{an}}\text{C}_d$  (*Bz*) und 20,5 mg (54  $\mu\text{mol}$ ) TPSNT vor. Dann vereinigte man die beiden Nucleotid-Komponenten unter Ar und dampfte noch 2mal mit abs. Pyridin ein. Die nachfolgende Zugabe von 1 ml abs. Pyridin führte zu einer klaren, farblosen Lsg. Das Kondensationsmittel wurde, gelöst in 1 ml abs. Pyridin, unter Ar zugegeben. Nach 6 h hydrolysierte man mit 1 ml  $\text{Pyridin}/\text{H}_2\text{O}$  1:1. Nach 1 h dampfte man das Gemisch ein und entfernte  $\text{H}_2\text{O}$  und Pyridin azeotrop. Nach Eindampfen aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  erhielt man 86 mg gelben Schaum. Dieses Rohprodukt wurde in wenig  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und auf einer präp. DC-Platte mit 15proz.  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  getrennt. Die das gewünschte Produkt enthaltende Zone wurde mit 25proz.  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. 14 mg (40%) voll geschütztes Tridecanucleosid-dodecaphosphat.

*d(TpTpMpCpGpTpCpApApApTpC)*. Bei 23° wurden 100  $\mu\text{l}$  einer 0,5M Lsg. von (*E*)-2-Nitrobenzaldehydoxim und 1,1,3,3-Tetramethylguanidin in Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$  1:1 zu 3 mg des vollgeschützten Tridecanucleotids gegeben. Nach 2 h wurde die Lsg. bei 0,1 Torr eingedampft und noch einmal mit 500  $\mu\text{l}$  abs. EtOH versetzt und erneut zur vollständigen Entfernung des  $\text{H}_2\text{O}$  eingedampft. Dann erfolgte Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  mit  $\text{NH}_3$  ges. MeOH. Die Lsg. wurde verschlossen 16 h bei 35° gehalten und dann bei 0,1 Torr eingedampft. Dann gab man zum Rückstand bei 0° 200  $\mu\text{l}$  vorgekühltes  $\text{HCOOH}/\text{MeOH}$  7:3. Darauf versetzte man die Lsg. mit 200  $\mu\text{l}$  Toluol und entfernte durch mehrmaliges Wiederholen dieses Vorgangs  $\text{HCOOH}$  azeotrop. Dann wurde in  $\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3$  aufgenommen und noch 15mal mit  $\text{CHCl}_3$  extrahiert. Die wässr. Phase wurde lyophilisiert. Das Lyophilisat nahm man in 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  auf und analysierte es mittels Ionenaustauscher-HPLC (*Partisil SAX*, System I). Ein Teil des ungeschützten Rohprodukts wurde mittels desselben Chromatographiesystems vorgereinigt und dann auf einer reversed-phase-Säule ( $\mu\text{-Bondapak C}_{18}$ , System III) entsalzt und gereinigt. Dadurch resultierten 12  $OD_{260}$ -Einheiten ungeschütztes Tridecanucleotids.

*O*-(2-Chlorphenyl)-*P*-(3-methyl-1-imidazolium)phosphonat (**10**). Zu einer Lsg. von 0,5 ml (6,3 mmol) 1-Methylimidazol in abs. Dioxan wurde bei 23° 1 ml (2-Chlorphenyl)-(2-cyanoäthyl)-phosphochloridat gegeben und 4 h gerührt. Das in farblosen Kristallen ausgefallene Produkt nutschte man unter Ar ab und kristallisierte aus abs. Aceton um: 380 mg sehr hygroskopisches **10** vom Schmp. 152–155°. UV( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): max. 262, 267, 274. IR(1% in KBr): u. a. 1340, 1335 (O=P–O–Aryl); 1240 (P–O–Aryl).  $^1\text{H-NMR}$ . (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,98 (s, 3H); 7,0–7,6 (m, 6H); 9,30 (br., 1H). Anal. ber. für  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{P}$  (272,63): C 44,05, H 3,69, N 10,27, Cl 13,02; gef.: C 43,51; 43,35, H 3,80; 3,71, N 10,31; 9,94, Cl 12,52.

*Enzymatischer Abbau*. Enzymlsg.: ca. 20 Einheiten (EU) Phosphodiesterase I aus Schlangengift wurden in 200  $\mu\text{l}$  0,33M Tris-Puffer gelöst und bei 0° aufbewahrt. Substratlsg.: 5  $OD_{280}$  des Tridecanucleotids wurden in 30  $\mu\text{l}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Bei 37° werden 10  $\mu\text{l}$  Substratlsg. zusammen mit 50  $\mu\text{l}$  Enzymlsg. 1 h inkubiert. Dann trennte man die Inkubationslsg. direkt mittels HPLC auf *Partisil-SAX* (System II) auf. Lösungen mit bekanntem Gehalt an den entsprechenden Nucleosidmonophosphaten und dem Nucleosid  $\text{T}_d$  wurden als externe Standards zur Eichung der Flächeneinheit der Spitzen verwendet. Somit wurden die Basenverhältnisse durch Flächenvergleich der Spitzen wie folgt ermittelt:  $\text{pA}_d/\text{pC}_d/\text{pG}_d/\text{pM}_d/\text{pT}_d/\text{T}_d = 4,2:2,9:1,0:1,2:2,8:1,1$ .

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] S. De Bernardini, G. Graf, C. A. Leach, P. Bühlmayer, F. Waldmeier, Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 639.
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature (London)* **1953**, *171*, 737; *ibid.* **1953**, *171*, 964.
- [3] N. Cerletti, Dissertation, Universität Basel, 1976.
- [4] P. Bühlmayer, G. Graf, F. Waldmeier, Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 2469.
- [5] P. Kohler, E. Volz, U. Séquin, Ch. Tamm, in 'Nucleic Acid Chemistry', Eds. L. B. Townsend und R. S. Tipson, Wiley-Interscience, Part 1, New York, 1978, S. 283.
- [6] H.-D. Schneider, Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 350.
- [7] G. Graf, Dissertation, Basel, 1980; E. Volz, Dissertation, Basel, 1977.
- [8] M. Hoffer, *Chem. Ber.* **1960**, *93*, 2777.
- [9] H. Vorbrüggen, K. Krolkiewicz, B. Bennua, *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1234; H. Vorbrüggen, G. Höfle, *ibid.* **1981**, *114*, 1256.
- [10] S. De Bernardini, F. Waldmeier, Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 2142; S. De Bernardini, Dissertation, Basel, 1983.
- [11] P.-E. Chabrier, N. H. Phuong, N. T. Thuong, P. Chabrier, *C.R. Séances Acad. Sci., Sér. C* **1979**, *288*, 379.
- [12] F. Waldmeier, S. De Bernardini, C. A. Leach, Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 2472.
- [13] R. Wetzel, H. L. Heyneker, D. V. Goedderl, P. Jhurani, J. Shapiro, R. Crea, T. L. K. Low, J. E. McClure, G. B. Thurman, A. L. Goldstein, *Biochemistry* **1980**, *19*, 6096.
- [14] C. B. Reese, L. Zard, *Nucl. Acid Res.* **1981**, *9*, 4611.
- [15] A. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 560.