

DIE BENZYLESTER VON DESOXYDINUCLEOSIDPHOSPHATEN UND
5'-O-(β,β,β) TRICHLORÄTHYLPHOSPHORYLTHYMIDYL-(3'-5')-
THYMIDYL-(3'-5') THYMIDIN ⁺)

K. H. SCHEIT

Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin,
Abteilung Chemie, Göttingen

(Received 22 May 1967)

UV-, IR- und NMR-Spektren von Oligonucleotiden in inerten Lösungsmitteln sind bisher nicht zugänglich gewesen, da diese stark hydratisierten Anionen in weniger polaren Lösungsmitteln unlöslich sind. Bei der Methylierung von Thymidyl-(3'-5') thymidin (I) mit Diazomethan beobachteten wir das Auftreten des Methylesters von I ¹⁾. Die Stabilität dieses Triesters veranlaßte uns, durch Reaktion von Desoxyoligonucleotiden mit Phenyl-diazomethan die entsprechenden Benzylester darzustellen und deren Eigenschaften zu untersuchen. (Zur Reaktion von Nucleotiden mit Phenyl-diazomethan vgl. Zitat ²⁾).

I reagierte als freie Säure nahezu quantitativ mit Phenyl-diazomethan zu Thymidyl-(3'-5') thymidin-benzylester (II) der durch präparative Dünnschichtchromatographie in Lösungsmittel A in 80-proz. Ausbeute isoliert werden konnte.

⁺) XII. Mitteilung, Synthese von Oligo- und Polynucleotiden,
XI. Mitteilung: F. Eckstein und I. Rizk, Angew. Chem. im Druck

(C₂₇H₃₃O₁₀N₄P MG 604.5

ber.: P 5.1 % N 9.3 %

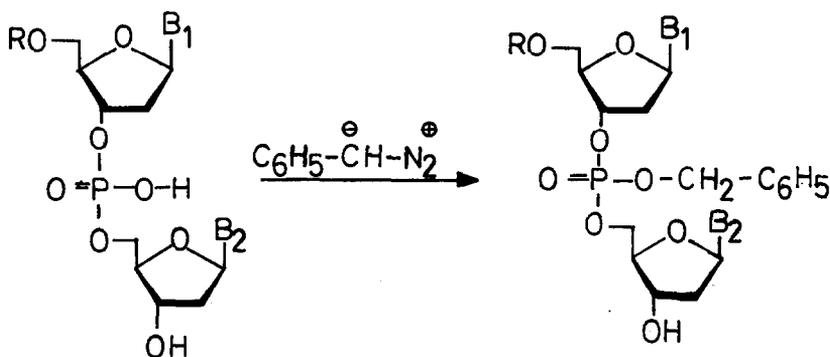
gef.: P 5.8 % N 9.5 %

UV: λ_{\max} 265 m μ $\frac{260}{280} = 1.68$; $\frac{260}{240} = 3.06$ in CH₃OH

λ_{\max} 263 m μ ; $\frac{260}{280} = 1.95$; $\frac{260}{240} = 1.37$ in CH₃OH/NaOH)

Benzylierung des Thymin in N³-Stellung wurde nicht beobachtet.

II wurde durch 80-proz. Essigsäure bei Raumtemperatur nicht hydrolysiert. Auch bei 100° C war nach 15 Minuten noch keine Spaltung des Triesters festzustellen. Mit NH₄OH erfolgte langsame Hydrolyse zu I



I R=H; B₁=B₂=Thymin

II R=H; B₁=B₂=Thymin

IV R=Trityl; B₁=B₂=Thymin

III R=Trityl; B₁=B₂=Thymin

V R=Monomethoxytrityl;
B₁=Adenin; B₂=Thymin

VIIa) R=Monomethoxytrityl;
VIIb) B₁=Adenin; B₂=Thymin

VII R=H; B₁=Adenin;
B₂=Thymin

II wurde durch Behandeln mit NaJ in Acetonitril bei 80° C quantitativ zu I debenzyliert. II reagierte in Pyridin mit Tritylchlorid zu 5'-O-Tritylthymidyl-(3'-5') thymidin-

benzylester (III), der in 40-proz. Ausbeute durch präparative Dünnschichtchromatographie an Silicagel in Lösungsmittel D isoliert wurde ($C_{46}H_{41}O_{10}N_4P$ MG 846.9

ber.: N 6.6 % P 3.7 %

gef.: N 6.1 % P 3.2 %;

UV: λ_{\max} 265 m μ $\frac{260}{280} = 1.59$ in CH_3OH ;

λ_{\max} 263 m μ $\frac{260}{280} = 1.75$ in $CH_3OH/NaOH$)

Saure Hydrolyse von III (80-proz. Essigsäure, 10 Minuten $100^\circ C$) führte zu II. Durch NaJ wurde III zu 5'-O-Tritylthymidylyl-(3'-5') thymidin (IV) debenzyliert. IV reagierte als Pyridiniumsalz in Äthanol mit Phenyldiazomethan in 80-proz. Ausbeute zu III, identisch mit dem nach der oben erwähnten Methode dargestellten Produkt. Aus dem Pyridiniumsalz des 5'-O-Monomethoxytrityldesoxyadenylyl-(3'-5') thymidin (V) entstanden mit Phenyldiazomethan zwei Substanzen VIa und VIb in 70-proz. Ausbeute, deren UV-Spektren und Analysen identisch waren.

($C_{47}H_{48}O_{11}N_7P$ MG 917.9 ber.: N 10.7 % P 3.4 %

gef.: VIa,N 10.6 % P 3,6 %

VIb,N 10.5 % P 3.5 %

UV: λ_{\max} 262 m μ $\frac{260}{280} = 3.37$, $\frac{260}{240} = 1.93$ in CH_3OH ;

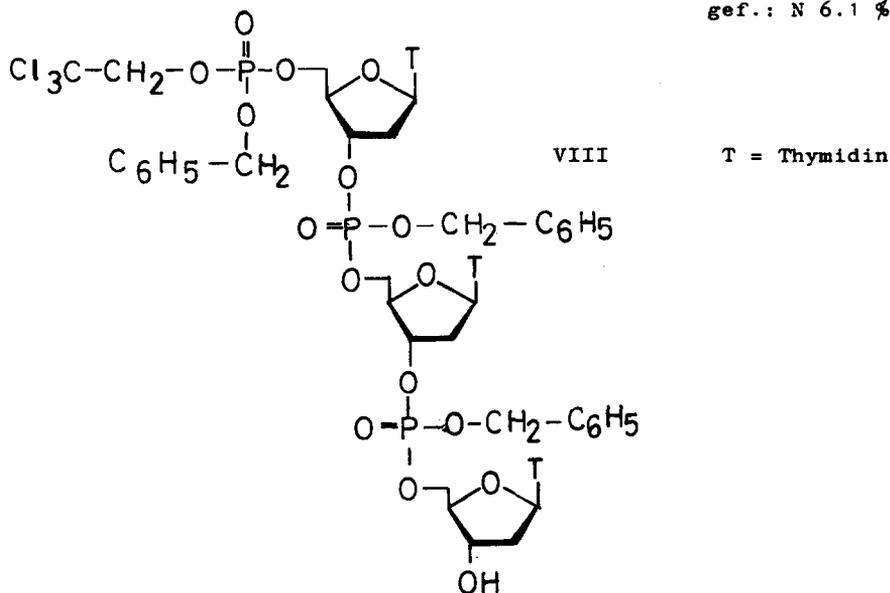
λ_{\max} 259 m μ $\frac{260}{280} = 3.13$, $\frac{260}{240} = 1.50$ in $CH_3OH/NaOH$)

VIa und VIb gaben nach saurer Hydrolyse (80-proz. Essigsäure 10 Minuten, $100^\circ C$) und Debenzylierung durch NaJ jeweils Desoxyadenylyl-(3'-5') thymidin (VII), welches durch Phosphodiesterase aus Snake Venom zu Desoxyadenosin und Thymidin-5'-phosphat im Verhältnis 1:1 gespalten wurde. Danach müssen VIa und VIb isomere Benzylester sein. Eine nähere Untersuchung

dieses Phänomen wurde begonnen.

5'-O-(β,β,β) Trichloräthylphosphorylthymidylyl-(3'-5')
thymidylyl-(3'-5')thymidin (IX) wurde als freie Säure mit
Phenyldiazomethan in den entsprechenden Tribenzylester
VIII überführt, der in 80-proz. Ausbeute isoliert werden

konnte ($C_{53}H_{60}O_{22}N_6Cl_3P_3$ MG 1332.4 ber.: N 6.3 % P 7.0 %
gef.: N 6.1 % P 6.6 %)



VIII konnte durch NaJ in Acetonitril quantitativ zu IX debenzyl-
liert werden, welches nach chromatographischer und enzymatischer
Analyse mit authentischem Material identisch war.

Alle dargestellten Triester wurden als feste, teils kristalline
Substanzen isoliert, die in organischen Lösungsmitteln wie
Chloroform, Acetonitril oder Aceton löslich waren.

Dünnschichtchromatographie

Die Chromatographie erfolgte an Silicagel-Fertigplatten HF₂₅₄

(Merck AG, Deutschland). Zur präparativen Dunnschichtchromatographie wurde Silicagel PF₂₅₄ (Merck AG, Deutschland) benutzt.

Lösungsmittel: A Butanol, gesättigt mit Wasser; B Isopropanol:

NH₄OH_{conc} : Wasser = 8:1:1; C Chloroform : CH₃OH = 9 : 1,

D Chloroform : CH₃OH = 95 : 5

Tabelle der R_f-Werte

	A	B	C	D
I	0.13	0.27		
II	0.63			
III	0.80			0.40
IV	0.25	0.45		
V	0.35	0.57		
VI			0.58 + 0.69	
VII		0.39		
VIII			0.43	

Literatur:

- 1) A. Holy und K. H. Scheit, Biochim.biophysica Acta 138, 230 (1967).
- 2) D. H. Brown, L. A. Heppel und R. J. Hilcoe, J. chem.Soc. 1954, 40