

- [4] International Tables for X-ray Crystallography, Vol. III, pp. 202–216, Birmingham: Kynoch Press (1962).
- [5] O. Bastiansen, L. Fernholt, H. M. Seip, H. Kambara & K. Kuchitsu, J. mol. Structure 18, 163 (1973).
- [6] D. W. J. Cruickshank, Acta crystallogr. 9, 754 (1956).
- [7] J. D. Dunitz & D. N. J. White, Acta crystallogr. A 29, 93 (1973).
- [8] I. Tokue, T. Fukuyama & K. Kuchitsu, J. mol. Structure 17, 207 (1973).
- [9] K. Kuchitsu, T. Fukuyama & Y. Morino, J. mol. Structure 4, 41 (1969).
- [10] M. Traetteberg, Acta chem. scand. 24, 2295 (1970).
- [11] L. S. Bartell & R. A. Bonham, J. chem. Physics 32, 824 (1960).
- [12] K. Lonsdale, Proc. Roy. Soc. A 123, 494 (1929).
- [13] H. K. Pal & A. C. Guha, Z. Kristallogr. A 92, 392 (1935).

83. Nucleoside und Nucleotide. Teil 8. Synthese von Dinucleotiden mit Thymidin und 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon als Bausteinen¹⁾

von Ivan Gregor, Urs Séquin und Christoph Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität, 4056 Basel

(13. I. 75)

Summary. In order to investigate the stability of 1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridone (*II*_a, 3) under the conditions of oligonucleotide synthesis, the dinucleoside monophosphates (MeOTr)*II*_a-T_d (9) and *II*_a-T_d (11), and the dinucleotides *II*_a-T_dp (15) and p*II*_a-T_d (19) were prepared, using various procedures. The N-glycosidic bond between the deoxyribose and the 2(1H)-pyridone proved to be much more labile than the one in the naturally occurring nucleosides. It was partially cleaved in condensation reactions with TPS or MS, but no cleavage was observed when DCC was used. Similarly, the glycosidic linkage was attacked by hot 80% acetic acid, the usual reagent for the removal of a *p*-methoxytrityl group in thymidine oligonucleotides. Milder treatment with acetic acid/pyridine 7:3 at 100° removed this protecting group and left the N-glycoside intact. The compounds prepared were characterized by paper and thin layer chromatography as well as by enzymatic degradation.

1. Einleitung. – Im Rahmen unserer Untersuchungen von Nucleotidderivaten mit 2(1H)-Pyridon als Base haben wir verschiedene Dinucleosid-monophosphate und Dinucleotide hergestellt, die als Bausteine Thymidin (1) und 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (*II*_a, 3)²⁾ [2] enthalten. Diese Arbeiten sollten Aufschluss vor allem darüber geben, wie sich dieses modifizierte Nucleosid (3) unter den Bedingungen der Oligonucleotid-Synthese (Einführung/Abspaltung von Schutzgruppen, Kondensationen, Phosphorylierungsreaktionen) verhält.

Zur Synthese von Dinucleosid-monophosphaten haben sich drei Methoden bewährt: (a) Kondensation eines Nucleosids mit einem Nucleosid-5'-phosphat [3]; (b) Kondensation eines Nucleosid-3'-phosphats mit einem Nucleosid [4]; und (c) Kondensation *via* die Triestermethode durch Umsatz eines Nucleosid-3'-(β -cyanoäthylphosphats) mit einem Nucleosid [5]. Bei allen drei Verfahren müssen die Kom-

¹⁾ Teil 7, siehe [1].

²⁾ Bzgl. Abkürzungen siehe [2].

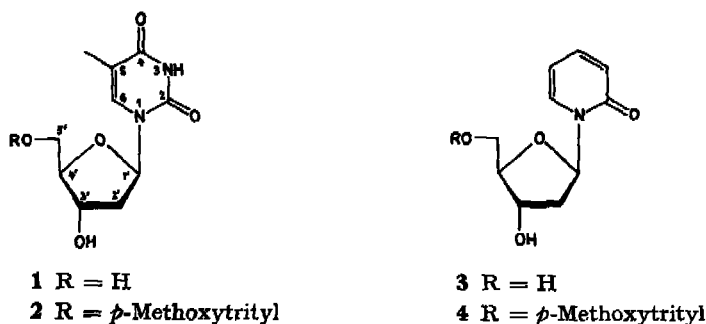
ponenten mit den nötigen Schutzgruppen versehen werden. Für unsere Versuche haben wir Methode (a) gewählt, weil sie gute Ausbeuten verspricht und die Ausgangsmaterialien leicht zugänglich sind: Desoxyribosid-5'-phosphate sind im allgemeinen käuflich und II_d kann als 5'-geschütztes Nucleosid eingesetzt werden.

Von den vielen bekannten Kondensationsmitteln [6] [7] haben wir die drei bewährtesten und am häufigsten verwendeten [8] benutzt: N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid (DCCI), Mesitylensulfonylchlorid (MS) und 2,4,6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid (TPS).

Als Schutzgruppen verwendeten wir: *p*-Methoxytrityl [9] zur Blockierung der 5'-Hydroxylgruppe, Acetyl für die 3'-HO-Gruppe [3] und β -Cyanoäthyl als Phosphorsäure-Schutzgruppe.

2. Synthese von 1-(5'-O-Monomethoxytrityl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon ((MeOTr) II_d , 4). – Das an der 5'-HO-Gruppe *p*-methoxytritylierte Nucleosid wurde in analoger Weise hergestellt wie das entsprechende Thymidin-derivat [10]. Das durch Umsatz von 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon (3) mit 1,26 Äquivalenten *p*-Methoxytritylchlorid erhaltene Rohprodukt musste allerdings, im Unterschied zum erwähnten Versuch mit Thymidin, mit Hilfe der Chromatographie an einer Kieselgelsäule gereinigt werden. Das chromatographisch reine Nucleosidderivat 4, das nur geringe Spuren des *p*-Methoxytritylalkohols enthielt, wurde als Öl gewonnen, das nach Entfernen des Lösungsmittels erstarrte. Es ist bisher nicht gelungen, das Produkt in kristalliner Form zu gewinnen. Durch Fällern aus Äther/Petroläther bei -70° wurde (MeOTr) II_d (4) schliesslich als amorphes Pulver erhalten. Dazu ist ein grosser Überschuss an Petroläther nötig, da andernfalls der feste Stoff wieder in ein Öl übergeht. Das so hergestellte (MeOTr) II_d war frei von jeglichen Spuren von *p*-Methoxytritylalkohol und liess sich durch Erhitzen mit Eisessig/Pyridin 7:3 vollständig in II_d (3) zurückspalten.

Schema 1



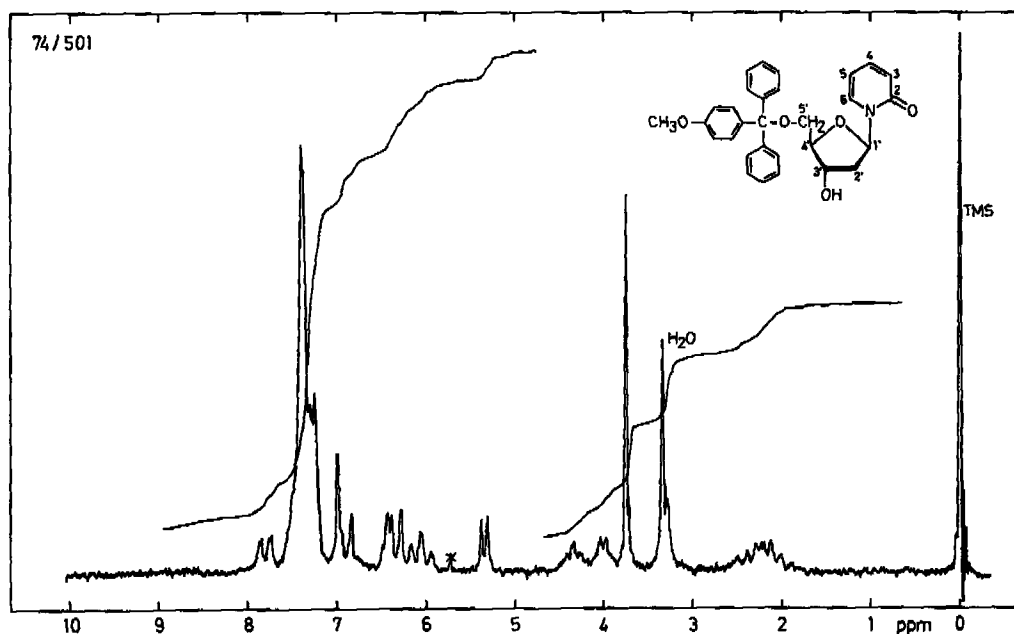
Die Konstitution von (MeOTr) II_d (4) wurde wie folgt bewiesen: Das UV.-Absorptionsmaximum bei 303 nm und die Schwingung im IR.-Spektrum bei 1650 cm^{-1} bestätigen, dass die N-glykosidische Bindung zwischen der Desoxyribose und dem 2(1*H*)-Pyridon nicht angegriffen worden ist. Die Anwesenheit der *p*-Methoxytritylgruppe kann aus dem NMR.-Spektrum abgelesen werden (vgl. Fig.): Es zeigt 10 aromatische Protonen der beiden Phenylsubstituenten bei 7,37 ppm, 4 aromatische Protonen des Methoxyphenylsubstituenten bei ca. 7,1 ppm und 3 Protonen bei

3,73 ppm, die der Methoxygruppe zuzuordnen sind. Eine Bestätigung der Verknüpfung der *p*-Methoxytritylgruppe mit der 5'-Hydroxygruppe lieferte der Befund, dass das im Spektrum von II_d sichtbare Triplett für das 5'-Hydroxyl-Proton (4,97 ppm) verschwunden, hingegen das mit D_2O austauschbare Dublett des 3'-Hydroxyl-Protons (5,33 ppm, $J = 4$ Hz) verblieben war. Ausser den Signalen für das C(4')-Proton und für die C(5')-Protonen zeigten alle übrigen Protonen sowohl im Spektrum von II_d (3) als auch in denjenigen von (MeOTr) II_d (4) die gleichen chemischen Verschiebungen. Die Verschiebung des Signals für das C(4')-Proton von 3,87 ppm für II_d (3) nach 4,00 ppm für (MeOTr) II_d (4) (nach tieferem Feld) und des Signals für die C(5')-Protonen von 3,62 ppm nach 3,29 ppm (nach höherem Feld) wird offenbar durch die Anwesenheit des aromatischen Systems verursacht, denn beim Paar T_d (1) und (MeOTr) T_d (2) kann der genau gleiche Effekt beobachtet werden (vgl. Tab. 1).

Tabelle 1. Chemische Verschiebung der C(4')- und C(5')-Protonen

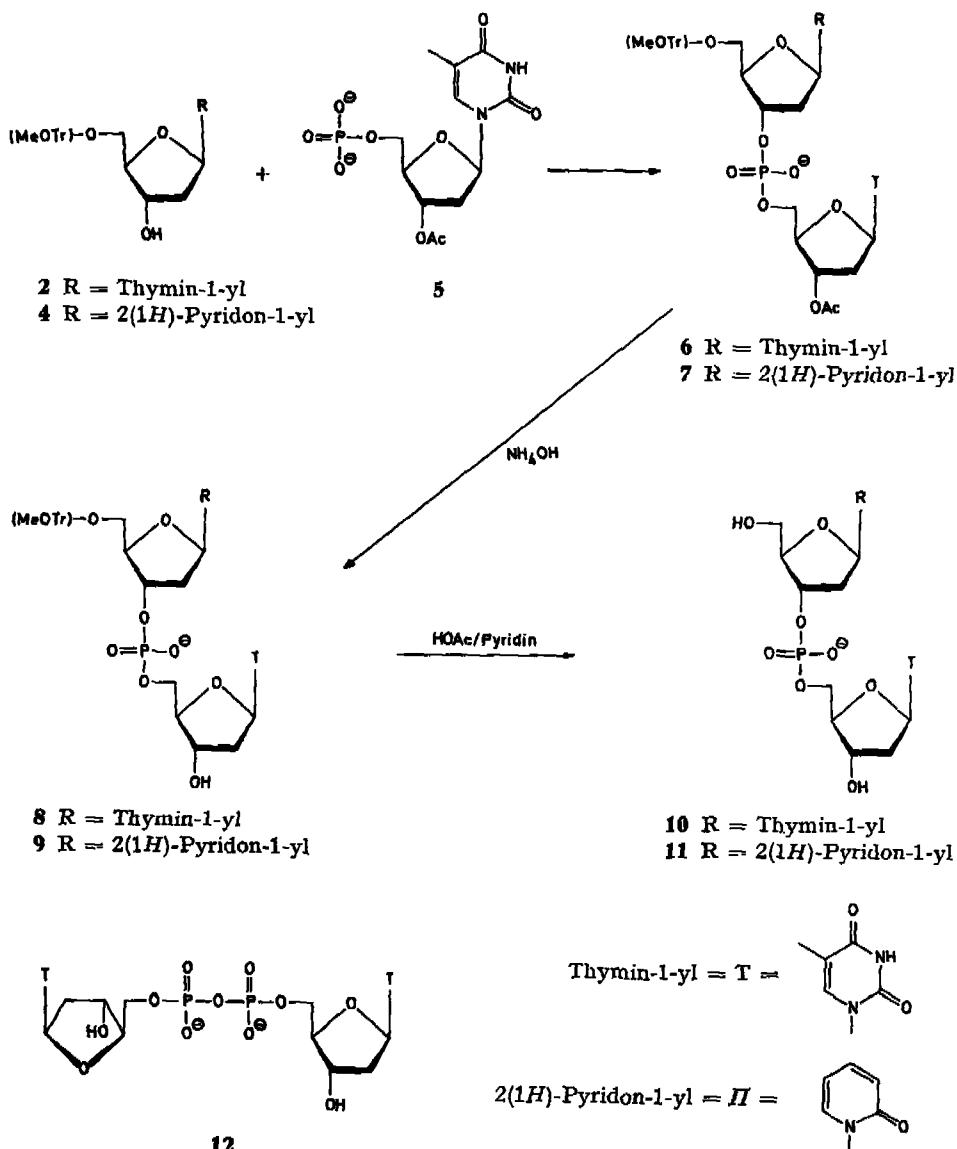
	C(4')—H		C(5')—H	
	δ	$\Delta\delta$	δ	$\Delta\delta$
II_d (3)	3,87 ^{a)}		3,62 ^{a)}	
(MeOTr) II_d (4)	4,00	– 0,13	3,29	0,33
T_d (1)	3,72 ^{b)}		3,59 ^{b)}	
(MeOTr) T_d (2)	3,91 ^{b)}	– 0,19	3,28 ^{b)}	0,31

^{a)} Werte aus [2]. ^{b)} Werte aus [10].

Fig. 60-MHz-NMR-Spektrum von (MeOTr) II_d (4) in $(CD_3)_2SO$

3. Synthese der Dinucleosid-monophosphate T_d-T_d und Π_d-T_d sowie ihrer 5'-*p*-Methoxytritylderivate. – Obwohl die Synthese von T_d-T_d (10) in der Literatur beschrieben ist [3] [11] [12], wurde sie hier zum Vergleich mit der von uns beabsichtigten Synthese von Π_d-T_d (11) unter genau bestimmten Bedingungen wiederholt. Annähernd äquimolare Mengen von (MeOTr) T_d (2) und p T_d (Ac) (5) wurden mit 5,5 Äquivalenten TPS in Pyridin umgesetzt. Das Gemisch wurde nach beendeter Reaktion zwischen Wasser und Petroläther verteilt. Der Petrolätherextrakt enthielt nur eine unbedeutende Menge des Ausgangsmaterials 2. Die Acetyl-

Schema 2



gruppe wurde aus dem gebildeten (MeOTr) T_d - T_d (Ac) (6) durch Behandlung mit 25proz. Ammoniak während 24 Std. bei Raumtemperatur entfernt. Die *p*-Methoxytritylgruppe liess sich aus dem resultierenden (MeOTr) T_d - T_d (8) durch Erhitzen mit Eisessig/Pyridin 7:3 auf 100° während 20 Min. abspalten. Zur Abtrennung des Kondensationsreagens vom freien Dinucleosid-monophosphat 10 erwies sich die Verteilung zwischen Wasser und 2-Butanol (evtl. 1-Butanol) als vorteilhaft. Die wässrige Phase enthielt das freie Dinucleosid-monophosphat 10 und das verbliebene pT_d , während die organische Phase TPS und den *p*-Methoxytritylalkohol enthielt. Die Ausbeute betrug nach Trennung an einer DEAE-Sephadex-Säule bzw. mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie 83,1% reines T_d - T_d (10). Die Ausbeuten erreichen nach Literaturangaben 80–90% (vgl. z.B. [6] [7]). Wichtig war die Feststellung, dass im Laufe dieser Synthese praktisch keine Nebenprodukte entstanden.

Die Herstellung und Isolierung von II_d - T_d (11) wurde nach derselben oben beschriebenen Methode ausgeführt. Die Reaktion wurde im Dünnschichtchromatogramm verfolgt und nach Verschwinden des Edukts (MeOTr) II_d (4) abgebrochen. Der Petrolätherextrakt enthielt nur 1–2% des Nucleosids 4. Dies bedeutet, dass praktisch das ganze Ausgangsmaterial verbraucht worden war. Die Ausbeute an Dinucleosid-monophosphat 11 betrug nach Trennung an der DEAE-Sephadex-Säule 63%. Der Grund für die niedrigere Ausbeute im Vergleich zur Synthese von T_d - T_d (10) scheint in einer teilweisen Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen der Desoxyribose und dem 2(1*H*)-Pyridon zu liegen. Bei der Trennung an der Säule wurden 7,6% (umgerechnet auf das eingesetzte (MeOTr) II_d) reines 2(1*H*)-Pyridon gefunden. Die organische Phase (2-Butanol) enthielt weiteres bei 295–300 nm absorbierendes Material (27,2% bezogen auf eingesetztes (MeOTr) II_d). Es könnte sich um eine Verbindung zwischen 2(1*H*)-Pyridon und TPS handeln. Allerdings ist es bis jetzt noch nicht gelungen, dieses Produkt vom Kondensationsreagens, von dem ein grosser Überschuss im Reaktionsgemisch war, abzutrennen.

Die Acetylgruppe wurde bei allen Synthesen der Dinucleosid-monophosphate 8–11 durch Hydrolyse mit 25proz. Ammoniak, und die *p*-Methoxytritylgruppe in den Dinucleosid-monophosphaten 6–9 durch Erwärmung auf 100° während 20–30 Min. mit einem Gemisch von Eisessig/Pyridin 7:3 entfernt. Die bei Thymidin-Oligonucleotiden übliche Methode zur Entfernung der *p*-Methoxytritylgruppe mit 80proz. wässriger Essigsäure bei 100° führt bei den II_d enthaltenden Verbindungen praktisch augenblicklich und quantitativ zum Bruch der glykosidischen Bindung zwischen dem 2(1*H*)-Pyridon und dem Zucker.

Nachdem gezeigt worden war, dass sich zur Synthese von II_d -haltigen Dinucleotiden im Prinzip die üblichen Methoden verwenden lassen, galt es, die in 5'-Stellung geschützten Oligonucleotide in reiner Form zu gewinnen. Diese Derivate sind wichtige Zwischenprodukte für den Aufbau von längeren Oligonucleotidketten.

Kondensation mit MS. Der Versuch, (MeOTr) II_d - T_d (9) mit MS als Kondensationsmittel herzustellen, verlief erfolgreich aber mit geringer Ausbeute (31%). Die Hauptschuld ist wohl in der Fähigkeit des MS zu suchen, die 3'-Hydroxygruppe, die im Nucleosid 4 enthalten ist, zu sulfonieren (vgl. auch [6] [13]). Ferner tritt wiederum teilweise Spaltung der glykosidischen Bindung ein, was zur Bildung von 2(1*H*)-Pyridon führt.

Kondensation mit TPS. Beim Einsatz von TPS als Kondensationsmittel war die Geschwindigkeit der Reaktion kleiner als bei der Verwendung von MS [7], die Ausbeute etwa gleich. Ausserdem ist TPS wegen seiner eigenen Raumerfüllung nicht in der Lage, die sekundäre alkoholische 3'-HO-Gruppe des Nucleosids **4** zu sulfonieren. In einer Reihe von Optimierungsversuchen wurden das Verhältnis von **4** zu TPS von 1:4 bis 1:6, die Molaritäten an **4** (in Pyridin) von 0,05 bis 0,2M variiert ohne nennenswerte Unterschiede im Ergebnis; Ausbeuten an (MeOTr) Π_d -T_d (**9**): 50–55% (vgl. Tab. 3). Nach der Reaktion wurden 5–10% Edukt **4** und 10–20% (bezogen auf eingesetztes Nucleosid **4**) 2(1*H*)-Pyridon gefunden. Ferner trat neben pT_d und einer kleinen Menge des Thymidinpyrophosphats T_d5'pp5'T_d (**12**, vgl. auch [14]), dessen Identität durch Vergleich mit einem auf anderem Wege synthetisierten Präparat (siehe exper. Teil) gesichert wurde, ein weiteres Nebenprodukt auf, dessen Eigenschaften einem bereits bei der Reaktion mit MS als Kondensationsmittel erhaltenen Nebenprodukt entsprachen (vgl. Diskussion).

Für die Trennung der genannten Reaktionsprodukte erwies sich wiederum die Verteilung des Reaktionsgemisches zwischen Wasser und 2-Butanol vor der Säulenchromatographie als günstig. Die wässrige Phase enthielt pT_d und T_d5'pp5'T_d (**12**), die organische Phase das tritylierte Dinucleosid-monophosphat **9** und TPS. Durch Zugabe einer kleinen Menge von Ammoniumhydrogencarbonat wurde eine bessere Trennung der Phasen erreicht und zugleich ein Absinken des pH verhindert. Bei erniedrigten pH-Werten könnte eine Abspaltung der *p*-Methoxytritylgruppe eintreten. Diese Massnahme erwies sich auch beim Eindampfen von Lösungen, die (MeOTr) Π_d -T_d(Ac) (**7**) oder (MeOTr) Π_d -T_d (**9**) enthielten, als vorteilhaft. Die durch Chromatographie an DEAE-Sephadex gereinigten Dinucleosid-monophosphate **7** resp. **9** zeigten im Dünnschichtchromatogramm unbedeutende Spuren eines Stoffes, der die *p*-Methoxytritylgruppe enthielt. Er liess sich weder durch Papierchromatographie noch durch Papierelektrophorese in 0,05M Phosphatpuffer (pH 7,5) oder 0,05M Acetatpuffer (pH 3,5) entfernen. Seine Abtrennung von (MeOTr) Π_d -T_d (**9**) gelang schliesslich durch vorsichtiges Ausschütteln zwischen Wasser und 2-Butanol, die Abtrennung von (MeOTr) Π_d -T_d(Ac) (**7**) durch Verteilen zwischen Wasser und Chloroform. Die Charakterisierung dieses Stoffes war unmöglich, da die gewonnenen Mengen äusserst gering waren.

Variation der Temperatur bei der Kondensationsreaktion mit TPS ergab, dass sowohl bei –18° wie auch bei 23° das Edukt (Nucleosid **4**) erst nach 4 Tagen verbraucht und das Endresultat praktisch dasselbe war.

Um die eventuelle Bildung von Nebenprodukten, die in reinem Pyridin entstehen können, möglichst auszuschalten [12] [15], wurde die Reaktion auch in Dimethylsulfoxid (mit zehnfachem Überschuss an Pyridin, bezogen auf (MeOTr) Π_d) durchgeführt. Auch nach 5 Tagen waren keine der Dinucleosid-monophosphate **7** resp. **9** nachweisbar.

Kondensation mit DCCI. Nach Literaturangaben werden für ähnliche Reaktionen Ausbeuten von 60–70% (vgl. z.B. [3] [4] [6]), nach neueren Arbeiten bei Zugabe von Pyridinium-Dowex-Ionenaustauscher bis über 90% erzielt (vgl. z.B. [6] [12] [16]). (Zur Funktion des Dowex, vgl. [6].)

Die Reaktanten wurden im Verhältnis von (MeOTr) Π_d (**4**)/pT_d(Ac) (**5**) = 1:1 bis 1:2; **4**/DCCI = 1:5 bis 1:11 eingesetzt. Die Konzentration von Pyridin betrug 0,03

bis 0,1 M bezogen auf (MeOTr) Π_d (4) (vgl. Tab. 3). Die Reaktionsdauer betrug 6–10 Tage. Im Verlaufe der Reaktion war die Bildung von *p*-Methoxytritylgruppe-haltigen Zwischen- bzw. Nebenprodukten festzustellen. Alle diese Stoffe, die 22–30%, umgerechnet auf das eingesetzte Nucleosid 4, ausmachten, wanderten im Dünnschichtchromatogramm schneller als das Nucleosid 4. Nach der Hydrolyse des Reaktionsgemischs mit Wasser schien sich aus diesen Nebenprodukten zum grossen Teil das Edukt 4 zu bilden. Die Bemühungen, sie in reiner Form zu isolieren, waren nicht erfolgreich (Papierchromatographie, Dickschichtchromatographie), da alle unpolaren Anteile des Gemischs von Dicyclohexylharnstoff begleitet werden. Es ist wahrscheinlich, dass (MeOTr) Π_d (4) mit dem Kondensationsreagens unter Bildung labiler Verbindungen reagiert, wie dies bereits in der Literatur bei analogen Reaktionen mit natürlichen Nucleosiden diskutiert worden ist [17]. Die Ausbeuten an Dinucleosid-monophosphat 7 resp. 9 bewegen sich zwischen 61 und 69%.

Eine Spaltung der glykosidischen Bindung wurde in keinem dieser Versuche festgestellt. Die Zugabe von Pyridinium-Dowex zum Reaktionsgemisch hatte keine Erhöhung der Ausbeute zur Folge.

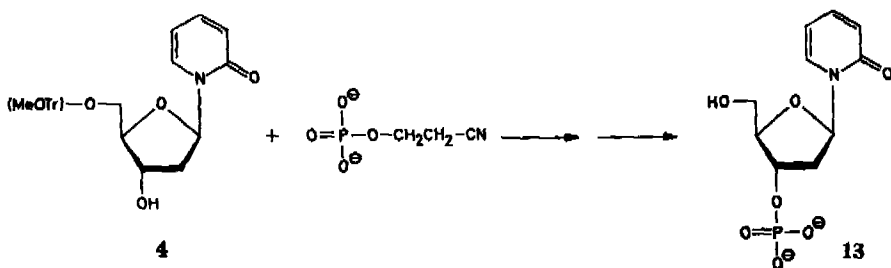
4. Verhalten des Dinucleosid-monophosphats Π_d -T_d (11) gegenüber Phosphoesterasen. – Das direkt oder durch Abspaltung der Schutzgruppen aus Dinucleosid-monophosphat 7 resp. 9 gewonnene Π_d -T_d (11) wurde mit Hilfe von Phosphodiesterasen aus Milz resp. Schlangengift (von *Russel's Viper*) charakterisiert. Es wurden die in [10] beschriebenen Methoden verwendet. Die Anwesenheit von eventuellen Phosphomonoesterasen in diesen Enzympräparaten wurde in parallelen Versuchen durch Inkubation von pT_d unter gleichen Bedingungen geprüft. Dabei wurde bei den verwendeten Präparaten der Milz-Phosphodiesterase keine und der Schlangengift-Phosphodiesterase nur eine unbedeutende Aktivität festgestellt. Der Verlauf der Inkubationen wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie verfolgt und die Reaktionsprodukte mittels Papierchromatographie getrennt. Π_d -T_d (11) wurde mit Hilfe beider Enzyme vollständig in Π_{ap} (13) und T_d (1) resp. in Π_d (3) und pT_d zerlegt, was zeigt, dass ausschliesslich die natürlichen 3'-5'-Phosphodiester-Bindungen vorhanden waren. Die bei der Trennung durch die Papierchromatographie erhaltenen UV.-absorbierenden Zonen wurden ausgeschnitten, zerkleinert und mit Wasser eluiert. Die Mengenverhältnisse wurden durch Messen der optischen Dichte bei 264 nm für Thymin enthaltende, resp. bei 302 nm für 2(1*H*)-Pyridon enthaltende Fragmente bestimmt. Das so erhaltene Verhältnis pT_d/ Π_d (Schlangengift-Phosphodiesterase) war 0,94, das Verhältnis T_d/ Π_{ap} (Milz-Phosphodiesterase) war 1,03, was beweist, dass das Verhältnis der Basen in Π_d -T_d (11) 1:1 beträgt. Rohes Schlangengift (aus *Crotalus adamanteus*), das hauptsächlich 5'-Nucleotidase und Phosphodiesterase enthält, spaltete Π_d -T_d innert 30 Min. vollständig zu Π_d (3) und T_d (1) (zur Methodik vgl. [2]).

Sowohl das während der Synthese von (MeOTr) Π_d -T_d (9) erhaltene T_d5'pp5'T_d (12) wie auch das auf anderem Wege hergestellte Vergleichspräparat wurde erwartungsgemäss durch Schlangengift-Phosphodiesterase (aus *Russel's Viper*) in pT_d gespalten. Milz-Phosphodiesterase war gegenüber diesem Substrat gänzlich inaktiv. Alkalische Phosphatase (aus *E. coli*) spaltete das Pyrophosphat 12 im Verlaufe von 30 Min. vollständig in T_d (1). Obwohl die Fähigkeit dieses Enzyms, Phosphatgruppen

von unsymmetrischen Nucleosid-polyphosphaten z.B. von pppT_d stufenweise abzuspalten, bekannt ist, ist seine Aktivität gegenüber symmetrischen Pyrophosphaten unseres Wissens bisher nicht geprüft worden. Eine generelle Bestätigung dieser Eigenschaften würde allerdings eine Reihe von Versuchen mit analogen Substraten erfordern.

5. Synthese von 1-(3'-O-Phosphoryl-2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (II_dp, 13). – Um auch das Verhalten der 2(1H)-Pyridon enthaltenden Nucleoside in Phosphorylierungsreaktionen kennenzulernen, wurden die hergestellten Dinucleosid-monophosphate mit β-Cyanoäthylphosphorsäure umgesetzt. Als Modellreaktion diente dabei zunächst die Phosphorylierung von II_d (3) zum entsprechenden 3'-Phosphat, II_dp (13). Wiederum wurden die gebräuchlichsten Kondensationsmittel, TPS und DCCI, miteinander verglichen.

Schema 3



Die Herstellung des Mononucleotids 13 wurde ähnlich wie von *Tener* für T_dp beschrieben vorgenommen [18]. Zur Isolierung wurde jedoch nicht die Fällung mit wässrigem Äthanol angewandt, sondern das Reaktionsgemisch wurde bei Verwendung von DCCI als Kondensationsmittel zuerst zwischen Wasser und Äther zur Entfernung des Dicyclohexylharnstoffs, dann, nach der Abspaltung der *p*-Methoxytritylgruppe, zwischen Wasser und Petroläther verteilt. Beim Einsatz von TPS als Kondensationsmittel wurde die Verteilung zwischen Wasser und Petroläther zur Entfernung der unpolaren Anteile und nach Abspaltung der *p*-Methoxytritylgruppe zwischen Wasser und 2-Butanol zur Entfernung von TPS vorgenommen. Das Mononucleotid 13, das in der wässrigen Phase vorlag, wurde schliesslich chromatographisch an einer DEAE-Sephadex-Säule, unter Verwendung eines linearen Gradienten von Ammoniumhydrogencarbonat oder papierchromatographisch mit 2-Propanol/Wasser/Ammoniak (25proz.) 7:2:1 als Fließmittel, gereinigt.

Bei der Umsetzung in Gegenwart von TPS in Pyridin (0,03–0,5M, bezogen auf das Nucleosid 4) wurden Nucleosid 4/β-Cyanoäthylphosphorsäure/TPS im Verhältnis von 1:3:5 bis 6 eingesetzt. Nach 4 bis 5 Std. war praktisch kein Ausgangsmaterial 4 mehr vorhanden; es wurde keine nennenswerte Bildung von Nebenprodukten wahrgenommen. Die Ausbeute an II_dp (13) betrug 82–86% (vgl. Tab. 3). Die Ausbeuten ähnlicher Reaktionen sind in der gleichen Grössenordnung (70–88%, vgl. z.B. [9] [18]).

Während sich ein doppelter Überschuss an TPS im Verhältnis zur Menge an β-Cyanoäthylphosphorsäure als genügend erwies, wurden bei der Synthese in Gegen-

wart von DCCI das Kondensationsmittel und β -Cyanoäthylphosphorsäure im Verhältnis von 3:1 eingesetzt (vgl. [4]). Die Reaktionsdauer betrug 24 Std.

Die im Vergleich zur ersten Methode etwas niedrigeren Ausbeuten von 71–75% (vgl. Tab. 3) gehen wohl in erster Linie auf die Bildung labiler Zwischenprodukte zurück, wie dies bereits bei der Herstellung von Dinucleosid-monophosphat **9** diskutiert worden ist (siehe oben).

Bei keinem der Versuche zur Herstellung von Π_{ap} (**13**) wurden eine Spaltung der glykosidischen Bindung beobachtet oder Produkte mit Pyrophosphatbindung festgestellt (vgl. [4]). Zur enzymatischen Charakterisierung der Produkte dienten alkalische Phosphatase und rohes Schlangengift (aus *Crotalus adamanteus*). Das 3'-Phosphat Π_{ap} (**13**) wurde mit Hilfe der alkalischen Phosphatase innert 30 Min. vollständig in freies Nucleosid Π_a (**3**) übergeführt. Das rohe Schlangengift liess das Nucleotid **13** nach 5 Std. Inkubation gänzlich intakt, während dem die Nucleosid-5'-phosphate pT_a und $p\Pi_a$ unter den gleichen Bedingungen bereits nach 30 Min. vollständig entphosphoryliert waren [2].

6. Synthese der in 3'-Stellung phosphorylierten Dinucleosid-monophosphate (MeOTr) Π_a -T $_a$ p (14**) und Π_a -T $_a$ p (**15**).** – Bei Verwendung von TPS als Kondensationsmittel wurden (MeOTr) Π_a -T $_a$ (**9**), β -Cyanoäthylphosphorsäure und TPS im Verhältnis von 1:3:10 eingesetzt. Die Lösung war 0,04M an **9** und die Reaktionsdauer betrug 6 Std. Beim Aufarbeiten des Reaktionsgemischs wurde 2(1H)-Pyridon gefunden, was auf Spaltung der glykosidischen Bindung deutet, eine kleine Menge Ausgangsmaterial **9**, ein *p*-methoxytrityl-haltiger Stoff, der dem bereits bei der Synthese der Dinucleosid-monophosphate **7** und **9** erwähnten Nebenprodukt zu entsprechen scheint, und ein beträchtlich polareres zweites Nebenprodukt mit sonst gleichen Eigenschaften. Letzteres besitzt offenbar eine zusätzliche Phosphatgruppe. Die Ausbeute an (MeOTr) Π_a -T $_a$ p (**14**) betrug 46%.

Bei der Phosphorylierung mit Hilfe von DCCI in Pyridin (0,014–0,03M an Dinucleosid-monophosphat **9**) führte die Variation des Verhältnisses von (MeOTr) Π_a -T $_a$ (**9**), β -Cyanoäthylphosphorsäure und DCCI in den Grenzen 1:4–10:100–200 zu keinen markanten Veränderungen in der Zusammensetzung der Produkte oder der Geschwindigkeit der Reaktion. Die optimale, aufgrund des Verschwindens des Ausgangsmaterials festgestellte Reaktionsdauer betrug 2 Tage. Nach dem Entfernen der Schutzgruppen wurde für die Trennung der Produkte die Säulen- oder Papierchromatographie benutzt. Eine Hydrolyse der glykosidischen Bindung war nicht festzustellen. Die Ausbeute an Π_a -T $_a$ p (**15**) betrug 60–71% (vgl. Tab. 3). In der Literatur werden für die Synthese von Desoxydinucleotiden vom Typ N_a - N_{ap} Ausbeuten von 55–68% angegeben (vgl. z.B. [4] [18]).

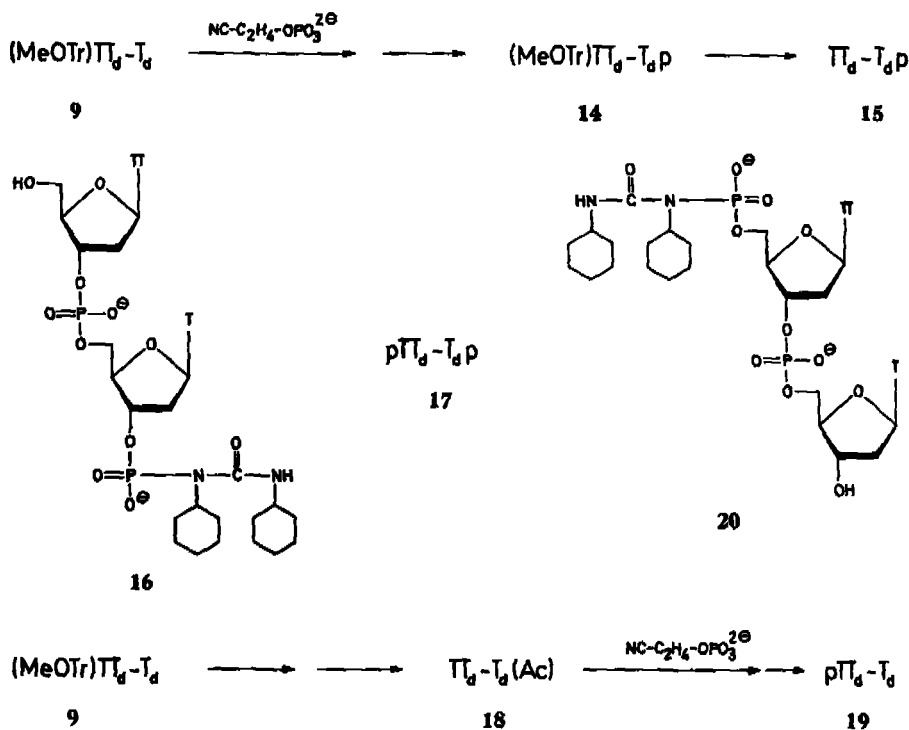
Weiter wurden 3–8% eines Stoffes gefunden, der die gleiche UV.-Absorption wie Π_a -T $_a$ (**11**) zeigt und sich auch im Dünnschichtchromatogramm und in der Papierchromatographie praktisch gleich wie **11** verhält. Während Π_a -T $_a$ (**11**) an der DEAE-Sephadex-Säule bei einer 0,03M Konzentration von Ammoniumhydrogencarbonat eluiert wird, erfordert die neue Substanz eine Konzentration von 0,075M Ammoniumhydrogencarbonat. Sie liess sich mit Milz-Phosphodiesterase spalten, war aber gegenüber Schlangengift-Phosphodiesterase beständig. Hydrolyse mit Hilfe von 25proz. Ammoniak während 3 Tagen ergab das Dinucleotid **15**. Aufgrund der ge-

nannten Eigenschaften wird vermutet, dass es sich bei diesem Stoff um **16**, d.h. um Π_d -T_dp, das noch eine Dicyclohexylharnstoff-Gruppe trägt, handelt (vgl. [19]).

Ausserdem wurden 8–11% des Nucleotids $p\Pi_d$ -T_dp (**17**) gefunden, das durch Abspaltung der *p*-Methoxytritylgruppe aus (MeOTr) Π_d -T_d (**9**) oder (MeOTr) Π_d -T_dp (**14**) während der Reaktion und zusätzliche Phosphorylierung entstanden sein muss. Der Strukturbeweis stützt sich auf das Verhalten bei der Chromatographie an der DEAE-Sephadex-Säule sowie bei der Papier- und Dünnschichtchromatographie. Die UV-Absorption war gleich wie die des Dinucleosid-monophosphats **11**. Die alkalische Phosphatase lieferte quantitativ Π_d -T_d (**11**), während Inkubation mit rohem Schlangengift **17** nicht veränderte.

Das tritylierte Dinucleotid (MeOTr) Π_d -T_dp (**14**), ebenfalls ein wichtiges Zwischenprodukt zur Synthese längerer Oligonucleotide, kann aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden, wenn nach der Abspaltung der β -Cyanoäthylgruppe mit Ammoniak auf die Essigsäure/Pyridin-Behandlung verzichtet wird. Ferner muss dem Reaktionsgemisch nach beendeter Kondensation eine kleine Menge Ammoniumhydrogencarbonat beigelegt werden. Es sollte stets ein kleiner Überschuss davon vorhanden

Schema 4



sein, um ein Absinken des pH-Wertes und damit die vorzeitige Hydrolyse der *p*-Methoxytritylgruppe zu verhindern; schon die Acidität des Dinucleotids **14** genügt zu ihrer vollständigen Abspaltung. Unerwartete Schwierigkeiten traten bei der Reinigung von (MeOTr) Π_d -T_dp (**14**) auf einer DEAE-Sephadex-Säule auf. Obwohl

das Dünnschichtchromatogramm nach der Reaktion praktisch nur das Vorhandensein des gewünschten Dinucleotids **14** zeigte, konnten nach der Chromatographie an DEAE-Sephadex bestenfalls 50% des Materials wieder zurückgewonnen werden. Auch hier scheint die Tritylgruppe dafür verantwortlich zu sein, dass die Elution der Verbindung von der Säule nur mit Mühe erreicht werden kann (vgl. Diskussion).

Die enzymatische Charakterisierung des direkt oder durch Abspaltung der *p*-Methoxytritylgruppe aus der Verbindung **14** bereiteten Dinucleotids Π_d -T_dP (**15**) ergab folgende Resultate: Durch 30 Min. Inkubation mit alkalischer Phosphatase wurde aus Π_d -T_dP (**15**) quantitativ Π_d -T_d (**11**) freigesetzt, das weiter wie oben beschrieben enzymatisch abgebaut und charakterisiert wurde. Gegenüber rohem Schlangengift war das Nucleotid **15** während 5 Std. beständig. Milz-Phosphodiesterase spaltete das Nucleotid **15** in T_dP (**13**) und T_dP. Diese Versuche bestätigen, dass es sich bei der hergestellten Verbindung tatsächlich um Π_d -T_dP (**15**) handelt.

7. Synthese des in 5'-Stellung phosphorylierten Dinucleotids $p\Pi_d$ -T_d (19**).** – Versuche, das Dinucleosid-monophosphat Π_d -T_d (**11**) durch Umsatz mit Phosphorsäure-bis-[2,2,2-trichloräthylester]-chlorid in 5'-Stellung zu phosphorylieren, führten nicht zum gewünschten Ergebnis, obwohl die Reaktion unter denselben Bedingungen, wie sie für die Phosphorylierung von Π_d (**3**) verwendet worden war, ausgeführt wurde. Dort hatte sie zu guten Ergebnissen geführt [2]. Würde die Reaktion erfolgreich verlaufen, so wäre der Schutz der 3'-Hydroxygruppe nicht nötig, denn das eingesetzte Reagens ist ein selektives Phosphorylierungsmittel für die 5'-Hydroxygruppe.

Es musste deshalb anders vorgegangen werden. Das tritylierte Dinucleosid-monophosphat (MeOTr) Π_d -T_d (**9**) wurde mit Essigsäureanhydrid in 3'-Stellung acetyliert. Anschliessend wurde zur Entfernung der *p*-Methoxytritylgruppe mit Eisessig/Pyridin behandelt. Das so erhaltene Reaktionsgemisch wurde zwischen Wasser und 2-Butanol verteilt. Das rohe Π_d -T_d(Ac) (**18**), das durch Abdampfen der Wasserphase und mehrmaliges Trocknen des festen Rückstands mit Pyridin gewonnen wurde, wurde entweder direkt für die Phosphorylierung eingesetzt oder zuerst noch durch Chromatographie an DEAE-Sephadex gereinigt.

Für die *Phosphorylierung mit TPS* in Pyridin (0,05M bezogen auf **18**) wurden Π_d -T_d(Ac), β -Cyanoäthylphosphorsäure und TPS im Verhältnis 1:2–3:6 eingesetzt; die Reaktionsdauer betrug 6 Std. Nach Entfernen der Acetyl- und β -Cyanoäthylgruppe mit Hilfe von 25proz. Ammoniak und Trennung an der DEAE-Sephadex-Säule resultierten 22–27% $p\Pi_d$ -T_d (**19**) (vgl. Tab. 3).

Ferner wurden 21–23% Π_d -T_d (**11**) (bezogen auf das eingesetzte Dinucleosid-monophosphat **18**), Thymidin-5'-phosphat und zwei Stoffe mit ähnlichen Eigenschaften, wie sie das bereits bei der Synthese der Dinucleosid-monophosphate erwähnte Nebenprodukt aufwies, erhalten. Vermutlich ist bei ihnen eine Spaltung der glykosidischen Bindung eingetreten (vgl. Diskussion). Die Inkubation dieser beiden Stoffe mit rohem Schlangengift hatte die Freisetzung von T_d (**1**) innert 30 Min. zur Folge. Die Spaltung verlief vollständig. Gemäss der gefundenen Menge von T_d (mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie) machen diese Nebenprodukte ungefähr 30% der Ausbeute aus. Die im Dünnschichtchromatogramm schneller laufende Verbindung erwies sich gegen alkalische Phosphatase vollständig resistent, während die

langsamer laufende Verbindung unter diesen Bedingungen (30 Min. bei 37°) teilweise hydrolysiert wurde. Dieser Befund wäre im Einklang mit der Annahme, dass es sich um zwei ähnliche Substanzen handelt, wobei sich die polarere von der weniger polaren nur durch eine zusätzliche Monophosphatgruppe unterscheidet.

Die Inkubation der im Dünnschichtchromatogramm schneller laufenden Verbindung mit Schlangengift-phosphodiesterase ergab freies pT_d , wobei die Reaktion langsamer verlief als bei der Spaltung von II_d-T_d (11). Das zweite Spaltstück, das vermutlich die Elemente von TPS enthält, konnte vorläufig nicht charakterisiert werden.

Bei der *Phosphorylierung mit DCCI* in Pyridin (0,013–0,02M bezogen auf 18) wurden $II_d-T_d(Ac)$, β -Cyanoäthylphosphorsäure und DCCI im Verhältnis von 1:5–7:100–250 (vgl. Tab. 3) eingesetzt; die Reaktionsdauer betrug 2–4 Tage. Nach 48 Std. war kein Ausgangsmaterial mehr nachzuweisen. Die Phosphorylierungen wurden sowohl mit rohem wie auch mit chromatographisch gereinigtem $II_d-T_d(Ac)$ (18) durchgeführt, um festzustellen, ob die unterschiedliche Reinheit der Präparate den Reaktionsverlauf beeinflusst. Nach der Kondensation wurden die Schutzgruppen mit 25proz. Ammoniak entfernt und das Produkt mittels Säulen- und Papierchromatographie gereinigt. Bei Verwendung von rohem $II_d-T_d(Ac)$ resultierten nach 48 Std. 48% an phosphoryliertem Produkt pII_d-T_d (19) und 47% Ausgangsmaterial (in der desacetylierten Form 11). Beim Einsatz von chromatographisch gereinigtem $II_d-T_d(Ac)$ steigt die Ausbeute an 19 auf 60% (zurückgewonnenes Ausgangsmaterial: 32%). Eine Spaltung der glykosidischen Bindung war nicht zu beobachten.

Als einziges weiteres Produkt, das in Mengen von 3,5–8% auftrat, wurde ein Stoff gefunden, der ähnliche Eigenschaften wie das Dinucleotid-Derivat 16 aufwies. Er zeigte die gleiche UV.-Absorption wie II_d-T_d (11). Im Dünnschichtchromatogramm und in der Papierchromatographie verhielt er sich gleichfalls sehr ähnlich wie das Dinucleosid-monophosphat 11. Während II_d-T_d (11) bei einer Konzentration von 0,03M Ammoniumhydrogencarbonat von der Säule eluiert wird, erforderte dieser Stoff eine Konzentration von 0,085M Ammoniumhydrogencarbonat. Obwohl das neue Nebenprodukt (20) praktisch dieselben Eigenschaften wie 16 hat, kann es sich bei diesen zwei Substanzen nicht um ein und dieselbe Verbindung (z.B. um ein Cyclodinucleotid [20]) handeln. Dies geht deutlich aus den enzymatischen Versuchen hervor. Schlangengift-Phosphodiesterase spaltete 20, während es gegenüber Milz-Phosphodiesterase resistent ist; das Dinucleotid-Derivat 16 verhielt sich zu diesen Enzymen genau umgekehrt. Beim Erhitzen mit einer Mischung Eisessig/Pyridin 7:3 lieferte 20 das Nucleotid pII_d-T_d (19). Vermutlich handelt es sich bei 20 um ein ähnliches eine Dicyclohexylharnstoff-Gruppe tragendes Phosphomonoester-Derivat, wie es von Khorana *et al.* bereits beschrieben worden ist [19].

Es ist nicht ganz klar, warum nach der Trennung des Reaktionsgemischs wieder Dinucleosid-monophosphat 11, also entacetyliertes Ausgangsmaterial, vorhanden ist, obwohl es während der Reaktion scheinbar ganz aufgebraucht war. Der Grund dafür könnte in der Bildung labiler Zwischenprodukte infolge einer Reaktion des Kondensationsmittels mit $II_d-T_d(Ac)$ (18) liegen (vgl. [17]). Die Möglichkeit, dass während einer verlängerten Reaktionsdauer mehr Ausgangsmaterial umgesetzt werden könnte, bestätigte sich nicht. Nach 9 Tagen Reaktionsdauer war keine signi-

fikante Änderung der Resultate zu beobachten; es bildete sich lediglich etwas mehr Dinucleotid-Derivat **20**.

Die enzymatische Charakterisierung von $p\Pi_d-T_d$ (**19**) ergab folgende Resultate: Inkubation mit alkalischer Phosphatase hatte eine quantitative Bildung von Π_d-T_d (**11**) zur Folge, das weiter wie oben beschrieben enzymatisch abgebaut und charakterisiert wurde. Schlangengift-Phosphodiesterase spaltete das Dinucleotid **19** vollständig in pT_d und $p\Pi_d$. Inkubation von **19** mit rohem Schlangengift lieferte bereits nach 5 Min. T_d (**1**) und Π_d (**3**). Gleich verhielt sich unter diesen Bedingungen das Dinucleosid-monophosphat **11**. Diese Versuche bestätigen, dass es sich bei der hergestellten Verbindung tatsächlich um $p\Pi_d-T_d$ (**19**) handelt.

8. Diskussion der Ergebnisse. – Ein Vergleich der Resultate zeigt, dass sich von den drei untersuchten Kondensationsmitteln MS, TPS und DCCI eindeutig das letztere am besten für die Synthese von Π_d -haltigen Oligonucleotiden eignet. Der grösste Nachteil der beiden Sulfonylchloride – von denen TPS die besseren Ausbeuten ergibt – ist, dass sie die glykosidische Bindung im Nucleosid Π_d unter Bildung von 2(1*H*)-Pyridon spalten.

Die wichtigsten Nebenprodukte, die bei den Reaktionen in Gegenwart von MS und TPS auftreten, haben ähnliche Eigenschaften. Bei der Säulenchromatographie und im Dünnschichtchromatogramm erscheinen sie praktisch an derselben Stelle. Sie enthalten eine *p*-Methoxytritylgruppe und weisen Absorptionsmaxima bei 257 und 264 nm auf. Wahrscheinlich handelt es sich um ein sulfoniertes Dinucleosid-monophosphat **9** bzw. **7** oder um ein gemischtes Anhydrid der 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäure und des Dinucleosid-monophosphats **9** resp. **7**, wobei in diesen Derivaten jeweils noch die 2(1*H*)-Pyridon-Base abgespalten worden ist. Die Vermutung, dass es sich um ein Derivat ohne 2(1*H*)-Pyridon-Base handelt, wird durch die Beobachtung gestützt, dass der Stoff beim Erwärmen mit Eisessig/Pyridin 7:3 pT_d freisetzt. Dies wäre im Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen Mechanismus der sauren Spaltung der Nucleotide [3] [21], der durch den säurekatalysierten Bruch der glykosidischen Bindung eingeleitet wird. Da aber das Essigsäure/Pyridin-Gemisch nicht in der Lage ist, diesen ersten Schritt einzuleiten, muss angenommen werden, dass in den erwähnten Dinucleotid-Derivaten die 2(1*H*)-Pyridon-Base bereits abgespalten war. Es ist nun auch ersichtlich, warum bei der Synthese von freiem Dinucleosid-monophosphat **11** keine Verbindung mit ähnlichen Eigenschaften gefunden wurde. Bei dieser Reaktionsfolge werden die Schutzgruppen vor dem Auftrennen des Reaktionsgemischs entfernt. Dabei werden während der Eisessig/Pyridin-Behandlung die oben erwähnten Nebenprodukte gespalten. Das Nucleosid (MeOTr) Π_d (**4**) und das Dinucleosid-monophosphat (MeOTr) Π_d-T_d (**9**) erwiesen sich in weiteren Versuchen als beständig gegenüber TPS in Pyridin-Lösung. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die Spaltung der glykosidischen Bindung während des Aufarbeitens geschieht, wie dies im Falle des N-Benzoyladenosins vermutet worden ist [22]. Die Bildung von Nebenprodukten und die Spaltung des Glykosids vollziehen sich offenbar während der eigentlichen Kondensationsreaktion.

Obwohl die Versuche mit DCCI zeitlich aufwendiger sind, erwies sich DCCI als das günstigste Kondensationsmittel für die Synthese der Dinucleosid-monophosphate **7**, **9** und **11**. Es liefert die besten Ausbeuten und führte keine Spaltung der glykosi-

dischen Bindung herbei. Ausserdem lässt es sich durch Verteilung zwischen Äther und Wasser abtrennen, bevor das Reaktionsgemisch chromatographiert wird, was beim Arbeiten mit TPS nicht möglich ist. Weiterhin lässt sich das Dinucleosid-monophosphat **7** durch einfaches Auswaschen der nach der Äther-Extraktion verbliebenen wässrigen Phase mit Chloroform in guter Reinheit gewinnen.

Auch bei den terminalen Phosphorylierungen erwies sich DCCI als das geeignetste Kondensationsmittel zur Synthese von Dinucleotiden, die 2(1*H*)-Pyridon als Base enthalten. Bei Verwendung von TPS wurde wiederum die glykosidische Bindung angegriffen und 2(1*H*)-Pyridon freigesetzt. Erstaunlicherweise unterblieb aber diese Abbaureaktion bei der Phosphorylierung des einfachen Nucleosids Π_d . Es wird daher vermutet, dass die Spaltung der glykosidischen Bindung durch die nucleofugen Eigenschaften des pT_d -Teils der Dinucleotide unterstützt wird.

Bei der Herstellung der Dinucleosid-monophosphate (MeOTr) Π_d - T_d (**9**) und Π_d - T_d (**11**) unter sonst gleichen Bedingungen fiel die Ausbeute in dem Fall, wo die tritylierte Verbindung **9** isoliert wurde, kleiner aus als bei der Isolierung des entsprechenden ungeschützten Dinucleosid-monophosphats, ein Verhalten das bereits von Weimann & Khorana [4] in einem ähnlichen Fall beobachtet wurde. Der Hauptgrund scheint im verschiedenen Verhalten der beiden Verbindungen bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose zu liegen. Während Π_d - T_d (**11**) rasch eluiert wird und in wenigen Fraktionen erscheint, verteilt sich (MeOTr) Π_d - T_d (**9**) auf viele Fraktionen. Die *p*-Methoxytritylgruppe bewirkt, dass **9** auf der Cellulose – durch elektrostatische Kräfte oder Adsorption – zurückgehalten wird. Elution mit wässrigem oder alkoholisch-wässrigem linearem Gradienten von Ammoniumhydrogencarbonat ändert nichts. Dieses Adsorptionsphänomen wurde auch schon zur groben Auftrennung von Reaktionsgemischen an «Tritylcellulose» verwendet. Bei diesem Verfahren werden zuerst alle Stoffe, die keine *p*-Methoxytritylgruppen enthalten, eluiert, und dann durch drastische Erhöhung des Äthanol-Gehalts des Elutionsgradienten die tritylierten Verbindungen ausgewaschen [23].

Von Glaser *et al.* [24] wurde vor kurzem über die Synthese von Oligonucleotiden, welche die unnatürliche 2(1*H*)-Pyridon-Base enthalten, berichtet. Jene Versuche wurden mit Hilfe der Festphasensynthese unter Verwendung eines makroporösen Trägers durchgeführt. Der Vergleich der beiden Methoden zeigt, dass in diesem Fall die klassische Kondensation in Lösung, bezüglich der Ausbeuten, der Synthese an einem festen Träger überlegen ist (vgl. Tab. 2).

Tabelle 2. Vergleich von Festphasensynthese und Synthese in Lösung

Produkt	Optimale Ausbeute in %	
	Festphasensynthese	Synthese in Lösung
T_d - T_d (10)	73	83
Π_d - T_d (11)	49	69*)
Π_d P (13)	51	86
Π_d - T_d P (15)	47	71

*) als (MeOTr) Π_d - T_d isoliert

Während beim Arbeiten in Lösung DCCI das beste Kondensationsmittel zu sein scheint, erwies sich bei der Festphasensynthese MS als das günstigste. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die voluminösen Verbindungen (TPS, DCCI) aus sterischen Gründen schlechter in den festen Träger eindringen und deshalb die Reaktionszentren der Reaktanten nicht so gut aktivieren können. Bei Verwendung von TPS bzw. MS bei der Synthese in Lösung wird die kleinere Ausbeute durch die Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen Zucker und 2(1*H*)-Pyridon bzw. durch Sulfonierung des Ausgangsmaterials verursacht. Ob diese Spaltung auch bei der Festphasensynthese eintritt, ist nicht bekannt, weil die Waschlösungen, die das 2(1*H*)-Pyridon enthalten hätten, nicht untersucht wurden.

Das Behandeln der Nucleotide, welche 2(1*H*)-Pyridon als Base enthalten, mit 80proz. wässriger Essigsäure bei 100° führte sowohl in Lösung als auch bei der Festphasensynthese [24] zur vollständigen Spaltung der glykosidischen Bindung. Diese Methode wurde jedoch normalerweise bei Thymidin-Oligonucleotiden zur Ablösung von polymeren Trägern, die die *p*-Methoxytritylgruppe enthalten, wie auch zur Entfernung dieser Schutzgruppe aus den Nucleotiden in Lösung, angewendet. Der Bruch der glykosidischen Bindung kann verhindert werden, wenn anstelle von 80proz. Essigsäure das Gemisch Eisessig/Pyridin 7:3 zur Abspaltung der *p*-Methoxytritylgruppe verwendet wird (vgl. auch [24]).

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekte No. 2.48.68, 2.460.71 und 2.675.72) für die gewährte Unterstützung.

Anmerkung bei der Korrektur: Neuere Versuche in unserem Laboratorium [25] haben gezeigt, dass diese Methode die glykosidische Bindung in *Purinderivaten* angreift, dass aber bei der schonenderen Behandlung mit 80proz. Essigsäure bei 23° [26] auch die glykosidische Bindung in *II_d* stabil ist.

Experimenteller Teil

1. Allgemeines. – Für die allgemeinen Arbeitsmethoden siehe [1] [24].

Änderungen und Ergänzungen: *NMR-Spektren* wurden mit einem Varian-A-60- oder EM-360-Spektrometer im Spektrallaboratorium unseres Instituts (K. Aegerter) aufgenommen. – Zur analytischen *Papierchromatographie* diente Papier Whatman No. 1, bei der präparativen *Papierchromatographie* Papier Whatman No. 3 und No. 3MM, und zur *Elektrophorese* wurde Whatman No. 3 verwendet. – *Fliessmittel* (v/v): A): 2-Propanol/H₂O/konz. Ammoniak 7:2:1; B): 1-Butanol/Eisessig/H₂O 5:2:3; C): Ameisensäure/Benzol/Methanol 1:5:4; D): Äthanol/1*M* wässriges Ammoniumacetat 7:3; E): 2-Propanol/H₂O/konz. Ammoniak 5,5:3,5:1; F): Methylenchlorid/Methanol 94:6; G): Benzol/Tetrahydrofuran 4:1; H): Methylenchlorid/Methanol 9:1; I): *t*-Butylalkohol/Methyläthylketon/H₂O/konz. Ammoniak 4:3:2:1; J): 1-Butanol/H₂O/konz. Ammoniak 85:10:5; K): Äthanol/1*M* wässriges Ammoniumacetat 9:1; L): 1-Propanol/H₂O/konz. Ammoniak 6:1:3. – Für die terminalen *Phosphorylierungen* wurde eine 1*M* Stammlösung von β -Cyanoäthylphosphorsäure (Pyridiniumsalz) in Pyridin hergestellt und verwendet [10]. Zum Einsatz kam der jeweilige Eindampfrückstand eines angegebenen Volumens dieser Lösung, der durch 3maliges Eindampfen seiner Lösung in je einem mehrfachen Volumen Pyridin jeweils vorgetrocknet wurde.

5'-O-Monomethoxytritylthymidin ((MeOTr) T_d, 2) aus T_d (1) wurde nach der von Falk & Tamm [10] beschriebenen Methode hergestellt. Nach Ausfällen des Rohprodukts aus Cyclohexan wurde es aus Äther umkristallisiert und ergab farblose Nadeln, die im DC. (Fließmittel F) einheitlich waren und gleich wie ein authentisches Material liefen. Smp. 128–129°; ϵ = 10300 (264 nm).

3'-O-Acetylthymidin-5'-phosphat (pT_d(Ac), 5) (Pyridiniumsalz) wurde durch Acetylierung von pT_d mit Essigsäureanhydrid nach [3] erhalten. Das Rohprodukt wurde in 1 ml abs. Pyridin gelöst und durch vorsichtiges Eintropfen in trockenen Äther ausgefällt. Das Produkt war im DC. (Fließmittel B und D) einheitlich. Es zeigte in wässriger Lösung ein UV.-Maximum bei 264 nm.

1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (II_a , 3) wurde nach dem Verfahren von Séquin & Tamm [2] hergestellt. Nach Entfernen der Schutzgruppen wurden durch Einengen des Gemisches aus Methylenchlorid (das 10% Methanol enthielt)/Aceton 1:20 Kristalle vom Smp. 116–117° erhalten.

Enzymversuche wurden mit «rohem» Schlangengift von *Crotalus adamanteus* (F. G. Celo, D-6660 Zweibrücken) nach [2], mit Milz-Phosphodiesterase (von Nutritional Biochemicals Corporation) nach [10], mit Schlangengift-Phosphodiesterase (Russell's Viper, B-Grade, Calbiochem.) ebenfalls nach [10], und mit alkalischer Phosphatase (*Escherichia coli*) (EC 3.1.3.1., Worthington Biochemical Corporation, Frechold, N.J.) nach [2] durchgeführt.

Die Basenverhältnisse wurden wie folgt bestimmt: Das untersuchte Nucleotid bzw. Dinucleosidmonophosphat wurde mit dem jeweiligen Enzym inkubiert. Das gesamte Inkubationsgemisch wurde papierchromatographisch in einzelne Komponenten getrennt. Die UV.-absorbierenden Zonen, die den einzelnen Komponenten entsprechen, wurden herausgeschnitten, zerkleinert und mit H_2O eluiert. Die Berechnung der Basenverhältnisse erfolgte durch Messen und Vergleichen der UV.-Absorption der einzelnen Komponenten.

2. $T_d5'pp5'T_d$ (12) aus $pT_d(AC)$ (5). – Die Synthese wurde in ähnlicher Weise durchgeführt wie bei Khorana [13] und Tener [20] beschrieben: Eine Lösung von 5,2 mg (0,01 mmol) $pT_d(AC)$ in 0,2 ml Pyridin, das 0,01 ml (0,043 mmol) Tri-*n*-butylamin enthielt, wurde mit 28 mg (0,14 mmol) DCCI und 20 Std. bei 23° stehengelassen. Hierauf wurde mit 0,5 ml Wasser während 24 Std. und zur Entacetylierung mit 5 ml 12*N* Ammoniak 20 Std. stehengelassen. Es resultierte praktisch ein einziges Produkt, das zwischen 40 ml Wasser und 30 ml 2-Butanol verteilt wurde. Die wässrige Phase wurde weiter mit Hilfe der präp. Papierchromatographie (Whatman No. 3, Fließmittel K) gereinigt.

3. 1-(5'-O-Monomethoxytrityl-2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon ((MeOTr) II_a , 4) aus II_a (3). – Eine Lösung von 0,35 g (1,66 mmol) II_a und 0,65 g (2,1 mmol) Monomethoxytritylchlorid wurde in trockenem Pyridin gelöst und zur Trockne eingedampft. Nach Zugabe von 5 ml trockenem Pyridin wurde das Gemisch 12 Std. im Dunkeln in verschlossenem Gefäß stehengelassen, anschliessend wurde mit 0,5 ml Methylalkohol während 2 Std. versetzt, dann eingedampft und der Rückstand zwischen 30 ml Methylenchlorid und 30 ml Wasser verteilt. Die Methylenchloridlösung wurde 2mal mit 10 ml Wasser extrahiert und diese ihrerseits mit 5 ml Methylenchlorid gewaschen. Die vereinigten Methylenchloridphasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet. Nach DC. (Fließmittel F) enthielt die Wasserphase kein Ausgangsmaterial. Die Methylenchloridphase enthielt ausser *p*-Methoxytritylalkohol und wenig Pyridin nur das Nucleosid 4. Das gelbe Öl, das nach dem Eindampfen der Methylenchloridlösung resultierte, wurde chromatographisch auf einer Kieselgel-Säule (48 × 4,1 cm) 250 g Kieselgel) gereinigt. Die Elution erfolgte mittels Methylenchlorid mit einem steigenden Gehalt an Methanol. Es wurden Fraktionen zu je 250 ml entnommen. – Frakt. 1–28 (0,5–2,5% Methanol) ergaben *p*-Methoxytritylalkohol, evtl. *p*-Methoxytrityl-methyläther und eine kleine Menge Pyridin. – Frakt. 29–33 (2,5–3% Methanol) ergaben das Nucleosid 4 und eine unbedeutende Menge *p*-Methoxytritylalkohol als gelbes Öl, das in trockenem Äther gelöst und auf –70° abgekühlt wurde. Nach Zugabe eines grossen Überschusses an Petroläther resultierte ein fester Stoff, der filtriert und wieder mit Petroläther gut gewaschen wurde. Die erhaltenen farblosen Flocken wurden im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet. Das Nucleosid 4 war im DC. (Fließmittel F) einheitlich. Die Ausbeute von (MeOTr) II_a (4) betrug 708 mg (88,5%), Smp. 76–78°, (nach Trocknen während 14 Std. bei 23° und 0,07 Torr). – UV. (Äthanol): 230 (19900), 276 (3910) (Schulter), 284 (4960), 303 (6560) nm (ϵ). – IR. (KBr): u.a. Banden bei 3380 (3'-OH) und 1650 cm^{-1} (C=O des Pyridonrings); 1600, 1500 und 1440 cm^{-1} (Phenyl); die Bande bei 3190 cm^{-1} (5'-OH) ist verschwunden. – 60-MHz-NMR. ((CD_3) $_2$ SO) (vgl. Fig.): 7,82, *m*, 1 H an C(6); 7,37, *m*, 10 H arom. + 1 H an C(4); 7,1, *AA'**BB'*, 4 H arom., *p*-Methoxyphenyl; 6,40, *m*, 2 H an C(3), C(1'); 6,05, *t*, 1 H an C(5), *J* = 7 Hz; 5,33, *d*, mit D_2O austauschbar, OH an C(3'), *J* = 4 Hz; 4,33, *m*, 1 H an C(3'); 4,00, *m*, 1 H an C(4'); 3,73, *s*, 3 H an –OCH $_3$; 3,29, *m*, 2 H an C(5') (teilweise verdeckt durch Signal von H $_2O$ bei 3,33); 2,6–1,9, *m*, 2 H an C(2').

$C_{30}H_{29}NO_5$	Ber. C 74.52	H 6.05	N 2.90	O 16.54%
(483.56)	Gef. „ 74.30	„ 6.14	„ 3.00	„ 16.41%

Zur weiteren Charakterisierung wurde bei einer Probe von (MeOTr) T_d (4) die *p*-Methoxytritylgruppe abgespalten. 5 mg 4 wurden in 0,5 ml des Gemischs von Eisessig/Pyridin 7:3 gelöst und während 30 Min. auf 100° erwärmt, danach zur Trockne eingedampft. Der *p*-Methoxytritylalkohol wurde mit Äther extrahiert. Das DC. (Fliessmittel H) zeigte, dass das Nucleosid 4 gänzlich in T_d (3) übergeführt worden war.

4. T_d - T_d (10) aus (MeOTr) T_d (2) und pT_d (Ac) (5). - 257 mg (0,5 mmol) (MeOTr) T_d (2) und 287 mg (0,55 mmol) pT_d (Ac) (5) wurden zur Trocknung 3mal in je 5 ml Pyridin gelöst und die Lösung eingedampft, der Rückstand in 3 ml Pyridin gelöst, mit 920 mg (3 mmol) TPS versetzt, nach 6 Std. Stehen mit 3 ml Wasser unter Eiskühlung versetzt, und 24 Std. bei 23° stehengelassen. Nach Zusatz von 30 ml 25proz. Ammoniak wurde nochmals 24 Std. bei 23° stehengelassen (Entfernung der Acetylgruppe aus 6).

Das Gemisch wurde dann zwischen 100 ml Wasser und 50 ml Petroläther verteilt. Der Petrolätherextrakt enthielt 20 OD₂₆₄-Einheiten von (MeOTr) T_d (2). Nach Eindampfen der wässrigen Phase wurde der trockene Rückstand in 20 ml Eisessig/Pyridin 7:3 aufgenommen und während 30 Min. auf 100° erwärmt (Entfernung der *p*-Methoxytritylgruppe aus 8). Dann wurde wieder eingedampft, der Rückstand in 100 ml Wasser gelöst und 2mal mit 50 ml 2-Butanol extrahiert. Die organische Phase wurde zur Trockne eingedampft; der Rückstand, der TPS, *p*-Methoxytritylalkohol und geringe Spuren von nucleotidischem Material enthielt, wurde nochmals in 50 ml Wasser gelöst und zur vollständigen Abtrennung von 10 mit 100 ml 1-Butanol extrahiert.

Die vereinigten wässrigen Phasen wurden auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1 × 95 cm), Hydrogencarbonatform, gegeben. Elutionsgradient: Mischgefäß: 2 l H₂O, Vorratsgefäß: 2 l 0,1 M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 23 ml; Durchflusgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient mM NH ₄ HCO ₃ n =	OD ₂₆₄ -Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf einge- setztes (MeOTr) T_d (2)	Substanz
40-50	0,021-0,03	350	3,9	T_d - T_d (10) (ein wenig verunreinigt)
51-62	0,03-0,035	6600	73,3	T_d - T_d (10)
63-75	0,035-0,041	550	6,1	T_d - T_d (10) (ein wenig TPS)
110-140	0,065-0,08	1500		pT_d

Das aus den Fraktionen Nr. 40-50 und 63-75 erhaltene Material wurde noch weiter papierchromatographisch (Whatman No. 3MM, Fliessmittel L) gereinigt. Es wurden dadurch weitere 9,8% (880 OD₂₆₄-Einheiten) gewonnen. Die gesamte Ausbeute an T_d - T_d (10) betrug 83,1%. Das auf diese Weise bereitete T_d - T_d war nach Papierchromatogramm (Fliessmittel L) und im DC. (Fliessmittel A) praktisch rein. Es wurde in Wasser gelöst und lyophilisiert, worauf T_d - T_d als farbloses Pulver resultierte. Durch Milz-Phosphodiesterase wurde es vollständig in T_d und T_d durch Schlangengift-Phosphodiesterase ebenfalls vollständig in T_d und pT_d gespalten.

5. T_d - T_d (11) aus (MeOTr) T_d (4) und pT_d (Ac) (5). - 100 OD₂₆₄-Einheiten (0,017 mmol, 7,5 mg) (MeOTr) T_d (4) und 9 mg (0,017 mmol) pT_d (Ac) (5) wurden 3mal durch Eindampfen der Lösung in je 3 ml Pyridin getrocknet. Darauf wurden 30 mg (0,1 mmol) TPS hinzugefügt, das Gemisch mit 0,5 ml trockenem Pyridin versetzt und 6 Std. im Dunkeln stehengelassen. Hierauf wurde unter Kühlen mit Eis 0,5 ml Wasser zugegeben und 14 Std. bei 23° stehengelassen, dann mit 10 ml 25proz. Ammoniak versetzt und nochmals während 24 Std. bei 23° stehengelassen (Entfernen der Acetylgruppe aus 7). Nach Eindampfen zur Trockne wurde der Rückstand zwischen 50 ml Wasser und 30 ml Petroläther verteilt. Der Petrolätherextrakt enthielt 2 OD₂₆₄-Einheiten des Ausgangsmaterials (MeOTr) T_d (4). Die Entfernung der *p*-Methoxytritylgruppe aus 9 und die

Verteilung zwischen Wasser und 2-Butanol, bzw. 1-Butanol, wurde wie bei 4. beschrieben vorgenommen.

Die vereinigten wässrigen Phasen, 65 OD₃₀₃-Einheiten enthaltend, wurden auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1 × 35 cm), Hydrogencarbonatform, gegeben. Elutionsgradient: Mischgefäss: 2 l H₂O, Vorratsgefäss: 2 l 0,075 M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 24 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,6 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient mM NH ₄ HCO ₃ x =	OD ₃₀₃ -Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf eingesetztes (MeOTr)II _d (4)	Substanz
1–3	0,00	7	7–8	2(1H)-Pyridon
22–29	0,01–0,015	4	4	II _d -T _d (11) (ein wenig TPS)
30–38	0,015–0,017	54	59	II _d -T _d (11)

Das Dinucleosid-monophosphat **11** war nach Papierchromatogramm (Fließmittel K und L) und im DC. (Fließmittel A und B, resp. C, E, I, J) einheitlich. Milz-Phosphodiesterase spaltet **11** vollständig in II_dp (**13**) und T_d (**1**), Schlangengift-Phosphodiesterase ebenfalls vollständig in II_d und pT_d. II_d-T_d zeigte im UV. Maxima bei 264 und 303 nm. Die Ausbeute an II_d-T_d (**11**) war 63%.

6. (MeOTr)II_d-T_d (9) aus (MeOTr)II_d (4) und pT_d(Ac) (5). – 6.1. Mit MS: 656 OD₃₀₃-Einheiten (0,1 mmol, 48,3 mg) (MeOTr)II_d (4) und 52,2 mg (0,1 mmol) pT_d(Ac) (5) wurden 3mal in je 3 ml trockenem Pyridin gelöst, die Lösung im RV. eingedampft und 4 Std. im Hochvakuum bei 25°/0,07 Torr getrocknet. Hierauf wurden unter Feuchtigkeitsausschluss 127 mg (0,57 mmol) MS zugegeben und in 1 ml Pyridin gelöst. Das Gemisch wurde 6 Std. in einem verschlossenen, lichtgeschützten Kolben bei 23° stehengelassen. Nach Zugabe von 1,2 ml Wasser unter Eiskühlung wurde bei 0° 24 Std. stehengelassen und nach Zugabe einer kleinen Menge Ammoniumhydrogencarbonat zur Trockne eingedampft. Das Gemisch wurde 3mal mit 20 ml Benzol ausgezogen. Die Benzol-Phasen enthielten 110 OD₃₀₃-Einheiten, meist in Form eines sulfonierten Produktes, von (MeOTr)II_d.

Der nach der Benzolextraktion verbliebene Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (55 × 4 cm), Hydrogencarbonatform, gegeben. Elutionsgradient: Mischgefäss: 2 l H₂O, Vorratsgefäss: 2 l 0,2 M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 18 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 0,7 ml/Min.

Das Dinucleosid-monophosphat **7** befand sich in den Fraktionen Nr. 163–233, die mit einem Gradienten von 0,15–0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat eluiert wurden. Die Fraktionen Nr. 163–200 enthielten ausser **7** auch pT_d(Ac) (5) und kleine Mengen undefinierter Verunreinigungen.

Die (MeOTr)II_d-T_d(Ac) (**7**) enthaltenden Fraktionen wurden eingedampft und durch Behandeln mit 10 ml 25proz. Ammoniak 24 Std. bei 23° in (MeOTr)II_d-T_d (**9**) übergeführt. Nach Eindampfen wurde der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen, 3mal mit 30 ml 1-Butanol ausgeschüttelt, die organische Phase 2mal mit je 3 ml Wasser zurückgewaschen. Die wässrigen Phasen enthielten hauptsächlich pT_d, während aus den 1-Butanol-Phasen das Produkt (MeOTr)-II_d-T_d (**9**) in einer Ausbeute von 31,1% gewonnen wurde (204 OD₃₀₃-Einheiten).

6.2. Mit TPS. 237,5 mg (0,49 mmol, 3225 OD₃₀₃-Einheiten) (MeOTr)II_d (4) und 261 mg (0,5 mmol) pT_d(Ac) (5) wurden 4mal durch Eindampfen der Lösung in je 10 ml Pyridin getrocknet. Nach Zugabe von 750 mg (2,5 mmol) TPS wurde mit 5 ml Pyridin versetzt und 6 Std. im Dunkeln und unter Feuchtigkeitsausschluss stehengelassen. Hierauf wurden unter Eiskühlung 5 ml Wasser zugegeben, 14 Std. bei 23° stehengelassen, dann mit 60 ml 25proz. Ammoniak versetzt und nochmals während 24 Std. bei 23° stehengelassen (Entfernung der Acetylgruppe aus **7**). Schliesslich wurde nach Zugabe von Ammoniumhydrogencarbonat zur Trockne eingedampft, der Rückstand 4mal in Wasser suspendiert und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde

gesammelt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen. Der feste Rückstand enthielt kein Dinucleosid-monophosphat **9** mehr; er bestand aus TPS und enthielt 5% des eingesetzten (MeOTr)II_a (**4**) (gemäss gefundenen OD₃₀₃-Einheiten). – DEAE-Sephadex-Säule (1 × 35 cm), Hydrogencarbonatform. Elutionsgradient: Mischgefäss: 3 l H₂O, Vorratsgefäss: 3 l 0,3 M NH₄HCO₃; zusätzlich: Mischgefäss: 1,25 l 0,3 M NH₄HCO₃, Vorratsgefäss: 1,25 l 0,45 M NH₄HCO₃; Fraktionsgrösse: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient κ M NH ₄ HCO ₃ κ =	OD ₃₀₃ -Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf eingesetztes (MeOTr)II _a (4)	Substanz
1–6	0,00	521	16	2(1H)-Pyridon
94–110	0,11–0,12		5	pT _a
111–120	0,12–0,13		2	T _a 5'pp5'T _a (12)
121–360	0,13–0,44	1758	54,5	(MeOTr)II _a -T _a (9) + geringe Verunreinigungen

Das Dinucleosid-monophosphat **9** aus den Fraktionen Nr. 121–360 wurde in 50 ml Wasser gelöst und sehr vorsichtig 3mal mit 50 ml 2-Butanol ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden 4mal mit 5 ml Wasser gewaschen und die wässrigen Lösungen 2mal mit je 2 ml 2-Butanol zurückgewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen enthielten pT_a und T_a5'pp5'T_a (**12**) (in sehr kleinen Mengen) neben Verunreinigungen, die im DC. beim Test für *p*-Methoxytritylgruppenthaltige Stoffe sichtbar waren, sowie geringe Mengen Dinucleosid-monophosphat **9**. Die vereinigten Butanol-Phasen, die das (MeOTr)II_a-T_a (**9**) enthielten, wurden zur Trockne eingedampft und aus Wasser lyophilisiert. Die Ausbeute an (MeOTr)II_a-T_a (**9**) war 54%.

6.3. Mit DCCI. 286 OD₃₀₃-Einheiten (0,044 mmol, 21 mg) (MeOTr)II_a (**4**) und 52 mg (0,1 mmol) pT_a(Ac) (**5**) wurden 3mal durch Eindampfen der Lösung in je 2 ml Pyridin getrocknet. Das Gemisch wurde in 1 ml Pyridin gelöst, unter Ausschluss von Feuchtigkeit mit 100 mg (0,5 mmol) DCCI versetzt und während 6 Tagen im Dunkeln bei 23° gerührt. Nach Stehen mit 1 ml Wasser (das unter Eiskühlung zugegeben wurde) während 16 Std. bei 23° wurden 5 ml Wasser/Pyridin 1:1 zugegeben und das Gemisch filtriert. Der Rückstand (hauptsächlich Dicyclohexylharnstoff) wurde noch 3mal mit 5 ml des gleichen Gemischs ausgewaschen. Das so gewonnene Filtrat wurde 3mal mit je 30 ml Äther ausgeschüttelt und die ätherischen Phasen 3mal mit 3 ml Wasser gewaschen. Die organischen Phasen enthielten 22% (63 OD₃₀₃-Einheiten) der Absorption des eingesetzten (MeOTr)II_a (**4**). Die wässrige Phase wurde 3mal mit 30 ml 2-Butanol ausgeschüttelt und die organischen Phasen 2mal mit 3 ml Wasser zurückgewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen enthielten pT_a(Ac) (**5**) und T_a5'pp5'T_a (**12**). Die organischen Phasen wurden eingedampft, der Rückstand in 10 ml Wasser aufgenommen und 6mal mit 20 ml Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase enthielt die restlichen Verunreinigungen, während die Chloroformphase neben einer kleinen Menge nicht-nucleosidischen Materials praktisch nur das Dinucleosid-monophosphat **7** enthielt.

Fraktion Nr.	Gradient κ M NH ₄ HCO ₃ κ =	OD ₃₀₃ -Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf eingesetztes (MeOTr)II _a (4)	Substanz
28–90	0,048–0,156	192	67,1	(MeOTr)II _a -T _a (Ac) (7)
91–100	0,156–0,172	9	3,2	(MeOTr)II _a -T _a (Ac) (7) + Spur <i>p</i> -Methoxytritylhaltiger Verunreinigung

Die vereinigten Chloroformphasen, die 213 OD₃₀₃-Einheiten enthielten, wurden zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1 × 35 cm), Hydrogencarbonatform, gegeben. Elutionsgradient: Mischgefäß: 2 l H₂O; Vorratsgefäß: 2 l 0,3 M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Die Fraktionen Nr. 91–100 wurden durch Verteilen zwischen Wasser und Chloroform gereinigt. Das Dinucleosid-monophosphat **7** befand sich in der Chloroformphase, während die Verunreinigung und das Dinucleosid-monophosphat (MeOTr)*II*_d-T_d (**9**), das sich durch Abspalten der Acetylgruppe aus dem Dinucleosid-monophosphat **7** während des Aufarbeitens gebildet hatte, in der Wasserphase verblieben. Das verwendete Chloroform muss sehr rein sein, da sonst eine unerwünschte Abspaltung der *p*-Methoxytritylgruppe eintreten kann. Die Ausbeute an (MeOTr)-*II*_d-T_d(Ac) (**7**) war 69%. Das Dinucleosid-monophosphat **7** wurde durch Behandeln mit 25proz. Ammoniak während 24 Std. bei 23° vollständig in (MeOTr)*II*_d-T_d (**9**) übergeführt.

Es wurde auch versucht, Dinucleosid-monophosphat **9** unter Zusatz von Pyridinium-Dowex herzustellen. Dazu wurde wie oben beschrieben vorgegangen, mit dem Unterschied, dass zum Reaktionsgemisch am Anfang zusätzlich Pyridinium-Dowex 50 gegeben wurde. Unter diesen Bedingungen betrugen die Ausbeuten an **9** 56–61%. – Das Reaktionsprodukt (MeOTr)*II*_d-T_d (**9**) wies UV.-Maxima bei 303 und 264 nm auf, enthielt eine *p*-Methoxytritylgruppe und verhielt sich einheitlich bei der Papierchromatographie (Fließmittel A und K) und im DC. (Fließmittel A und I resp. J).

6.4. Versuch mit TPS und (CH₃)₂SO als Lösungsmittel. 24,2 mg (0,05 mmol) (MeOTr)*II*_d (**4**) und 26,2 mg (0,05 mmol) pT_d(Ac) (**5**) wurden 3mal durch Eindampfen der Lösung in je 3 ml Pyridin getrocknet, 75 mg (0,25 mmol) TPS zugefügt und in 3 ml Dimethylsulfoxid, 0,5 mmol Pyridin enthaltend, gelöst. Nach 5 Tagen war (MeOTr)*II*_d (**4**) noch gänzlich unverändert.

7. *II*_d-T_d (**11**) aus (MeOTr)*II*_d-T_d (**9**). – 70 OD₃₀₃-Einheiten (8,5 mg) **9** wurden mit 5 ml Eisessig/Pyridin 7:3 während 30 Min. auf 100° erwärmt und hierauf wiederholt bis zum Verschwinden des Essigsäuregeruchs mit Wasser eingedampft. Der Rückstand wurde in 30 ml Wasser aufgenommen und 2mal mit 10 ml Petroläther extrahiert zur Entfernung des *p*-Methoxytritylalkohols. Nach DC. (Fließmittel A) waren *II*_d-T_d (**11**) und geringe Mengen von nicht-umgesetztem **9** vorhanden. Die Trennung wurde an der DEAE-Sephadex-Säule (1 × 60 cm) vorgenommen. Der Gradient war 1 l Wasser und 1 l 0,05 M NH₄HCO₃; die Fraktionengrösse betrug 23 ml; die Durchflussgeschwindigkeit war 1,5 ml/Min. Als einziges Produkt wurde das Dinucleosid-monophosphat **11** in einer Ausbeute von 95% eluiert (bei einer Konzentration von 0,02–0,036 M NH₄HCO₃). Eine Spaltung der glykosidischen Bindung wurde nicht beobachtet.

8. Überprüfung der Beständigkeit von (MeOTr)*II*_d (**4**) bzw. (MeOTr)*II*_d-T_d (**9**) in Gegenwart von TPS. – 5 mg (0,01 mmol) (MeOTr)*II*_d (**4**) wurden durch 3maliges Eindampfen ihrer Lösung in je 2 ml Pyridin getrocknet. Danach wurden 30 mg (0,1 mmol) TPS und 0,5 ml Pyridin zugefügt. Nach 6 Std. wurde unter Eiskühlung 1 ml Wasser zugegeben, 14 Std. bei 23° stengelassen und nach Zugabe von Ammoniumhydrogencarbonat eingedampft. DC. (Fließmittel A) zeigte praktisch nur die Anwesenheit von TPS und unverändertem Nucleosid **4**.

2 mg (0,0048 mmol) (MeOTr)*II*_d-T_d (**9**) wurden durch 3maliges Eindampfen ihrer Lösung in je 1 ml Pyridin in Gegenwart eines grossen Überschusses von TPS (60 mg, 0,2 mmol) getrocknet, dann in 0,5 ml Pyridin gelöst und 6 Std. bei 23° stengelassen. Nach Versetzen unter Eiskühlung mit 1 ml Wasser wurde 6 Std. bei 23° stengelassen und nach Zugabe von Ammoniumhydrogencarbonat eingedampft. Der Rückstand zeigte im DC. (Fließmittel A) nur unverändertes Dinucleosid-monophosphat **9**.

9. *II*_dp (**13**) aus (MeOTr)*II*_d (**4**). – 9.1. Mit DCCI. Dem vorgetrockneten Eindampfrückstand von 0,1 ml (0,1 mmol) der 1 M Stammlösung von β-Cyanoäthylphosphorsäure wurde in 2 ml Pyridin aufgenommen und zu 116 OD₃₀₃-Einheiten (0,018 mmol, 8 mg) (MeOTr)*II*_d (**4**) hinzugefügt. Das Gemisch wurde durch 3maliges Eindampfen seiner Lösung in je 2 ml Pyridin weiter getrocknet, dann in 0,4 ml Pyridin gelöst und 100 mg (0,5 mmol) DCCI unter Feuchtheitsausschluss zugefügt. Nach 24 Std. bei 23° wurde, nach Zugabe von 1 ml Wasser unter Eiskühlung, weitere 3 Std. bei 23° stengelassen. Nach Versetzen des Gemisches mit 10 ml Pyridin/Wasser 1:1 wurde filtriert und der Rückstand (hauptsächlich Dicyclohexylharnstoff) noch 4mal mit je 5 ml des gleichen Gemisches nachgewaschen. Das Filtrat wurde 3mal mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt

und die Ätherphasen wiederum 2mal mit je 5 ml Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Auszüge wurden eingedampft und mit 10 ml 25proz. Ammoniak 24 Std. bei 23° stehengelassen (Entfernung der β -Cyanoäthylgruppe). Das Gemisch wurde nach Eindampfen in 5 ml Eisessig/Pyridin 7:3 gelöst, 30 Min. auf 100° erhitzt (Entfernung der p -Methoxytritylgruppe) und anschliessend zur Trockne eingedampft. Der p -Methoxytritylalkohol wurde durch 2maliges Waschen des Rückstands mit je 20 ml Petroläther entfernt.

Der Rest wurde in Wasser aufgenommen (enthält 81% OD₃₀₃-Einheiten umgerechnet auf das eingesetzte Nucleosid 4) und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1 × 35 cm), Hydrogencarbonatform, gegeben. Elutionsgradient: Mischgefäss: 1 l H₂O; Vorratsgefäss: 1 l 0,2M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient × M NH ₄ HCO ₃ × =	OD ₃₀₃ -Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf eingesetztes (McOTr)II _d (4)	Substanz
2	0,00	1,6	1,5	II _d (3)
3–18	0,005–0,05	4	3,7	wahrscheinlich II _{ap} (CNet)
28–42	0,065–0,115	80	75	II _{ap} (13)

Die Ausbeute an II_{ap} (13) betrug 75%.

9.2. Mit TPS. Dem vorgetrockneten Eindampfrückstand von 0,05 ml (0,05 mmol) der Stammlösung von β -Cyanoäthylphosphorsäure wurden 7,5 mg (100 OD₃₀₃-Einheiten, 0,017 mmol) (McOTr)II_d (4) zugefügt und das Gemisch noch einmal durch Eindampfen seiner Lösung in 3 ml Pyridin getrocknet. Sodann wurde es in 0,25 ml Pyridin gelöst und 26 mg (0,09 mmol) TPS in 0,25 ml Pyridin beigelegt. Nach 5,5 Std. bei 23° wurde (unter Eiskühlung) mit 1 ml Wasser versetzt und 5 Std. bei 23° stehengelassen, dann mit 5 ml 25proz. Ammoniak 12 Std. bei 23° stehengelassen (Entfernung der β -Cyanoäthylgruppe). Nach Eindampfen wurde der Rückstand zwischen 40 ml Wasser und 40 ml Petroläther verteilt. Der Petroläther enthielt 3% des eingesetzten Edukts (McOTr)II_d (4). Das in der wässrigen Phase enthaltene Material wurde zum Entfernen der p -Methoxytritylgruppe mit 5 ml Eisessig/Pyridin 7:3 während 25 Min. bei 100° behandelt. Darauf wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen, die Lösung 2mal mit je 30 ml 2-Butanol ausgeschüttelt und die Auszüge 2mal mit je 3 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase enthielt 3–4% (McOTr)II_{ap} (umgerechnet auf das eingesetzte 4).

Die wässrige Phase enthielt hauptsächlich II_{ap} (13), das auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1 × 35 cm), Hydrogencarbonatform, gegeben wurde. Elutionsgradient: Mischgefäss: 1 l H₂O; Vorratsgefäss: 1 l 0,2M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient × M NH ₄ HCO ₃ × =	OD ₃₀₃ -Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf eingesetztes (McOTr)II _d (4)	Substanz
1–4	0,00	4,6	5	II _d (3)
40–55	0,07–0,12	76	82,6	II _{ap} (13)
56–80	0,12–0,185	3	3,2	nicht identif., möglicherweise (pII _{ap})

Das aus den Fraktionen Nr. 40–55 stammende Nucleotid II_{ap} (13) (Ausbeute 82,6%) wies im UV. ein Maximum bei 303 nm auf und war papierchromatographisch (Fließmittel A und K resp. L) und im DC. (Fließmittel A und B) einheitlich. Alkalische Phosphatase spaltete 13 vollständig zu II_d (3), rohes Schlangengift liess 13 gänzlich unverändert.

10. (MeOTr) Π_d -T_dP (14) resp. Π_d -T_dP (15) aus (MeOTr) Π_d -T_d (9). – 10.1. Mit TPS. Dem vorgetrockneten Eindampfrückstand von 0,1 ml (0,1 mmol) der Stammlösung von β -Cyanoäthylphosphorsäure wurden 25 mg (0,031 mmol, 205 OD₃₀₂-Einheiten) **9** hinzugefügt. Das ganze Gemisch wurde noch 2mal durch Eindampfen seiner Lösung in je 3 ml Pyridin getrocknet, dann 100 mg (0,33 mmol) TPS zugegeben und das Gemisch in 1 ml Pyridin gelöst. Nach 6 Std. bei 23° im Dunkeln wurde unter Eiskühlung mit 1,2 ml Wasser versetzt, 6 Std. bei 23° und nach Zugabe von 20 ml 25proz. Ammoniak nochmals 16 Std. bei 23° stehengelassen (Entfernung der β -Cyanoäthylgruppe). Nach Zugabe von Ammoniumhydrogencarbonat wurde eingedampft, dann in Wasser aufgenommen und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (4 × 60 cm), Hydrogencarbonatform), gegeben. Elutionsgradient: Mischgefäß: 3 l 0,03 M NH₄HCO₃; Vorratsgefäß: 3 l 0,3 M NH₄HCO₃; Zusätzlich Mischgefäß: 1 l 0,3 M NH₄HCO₃; Vorratsgefäß: 1 l 0,4 M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 20 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,3 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient x M NH ₄ HCO ₃ x =	Substanz
10–30	0,03	2(1H)-Pyridon
170–220	0,22–0,26	(MeOTr) Π_d -T _d (9) (wenig)
240–290	0,30–0,34	(MeOTr) Π_d -T _d P (14) + geringe Menge <i>p</i> -Methoxytritylgruppe-haltige Verunreinigungen

Zur Entfernung der Verunreinigungen in den Fraktionen Nr. 240–290 wurde mit 50 ml Wasser versetzt und 2mal mit je 30 ml 1-Butanol ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden 3mal mit je 5 ml Wasser gewaschen und die wässrigen Phasen mit 2 ml 1-Butanol ausgeschüttelt. Die Reinigung kann auch mit Hilfe der Papierchromatographie (*Whatman* No. 3, Fließmittel L) vorgenommen werden. Die Ausbeute an (MeOTr) Π_d -T_dP (14) war 46%. Lyophilisierung aus Wasser ergab ein farbloses, watteartiges Präparat.

10.2. Mit DCCI. Der vorgetrocknete Eindampfrückstand von 0,15 ml (0,15 mmol) der Stammlösung von β -Cyanoäthylphosphorsäure wurde mit 11 mg (0,014 mmol, 90 OD₃₀₂-Einheiten) (MeOTr) Π_d -T_d (9) versetzt und das Gemisch noch 3mal durch Eindampfen seiner Lösung in je 2 ml Pyridin getrocknet, anschliessend in 1 ml Pyridin gelöst und nach Zugabe von 560 mg (2,8 mmol) DCCI 48 Std. bei 23° stehengelassen. Nach Zugabe von 1 ml Wasser unter Eiskühlung wurde weitere 14 Std. bei 23° stehengelassen, dann mit 10 ml Pyridin/Wasser 1:1 versetzt und filtriert. Der Rückstand (hauptsächlich Dicyclohexylharnstoff) wurde 4mal mit 5 ml des gleichen Gemisches nachgewaschen. Die wässrige Phase wurde 3mal mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt und dieser durch 2maliges Ausschütteln mit je 3 ml Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde eingedampft, mit Eisessig/Pyridin 7:3 30 Min. auf 100° erhitzt und zur Trockne eingedampft. Der *p*-Methoxytritylalkohol wurde durch 2maliges Waschen des Rückstandes mit je 20 ml Petroläther entfernt.

Fraktion Nr.	Gradient x M NH ₄ HCO ₃ x =	OD ₃₀₂ -Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf eingesetztes (MeOTr) Π_d -T _d (9)	Substanz
14–23	0,015–0,025	2	2,4	Π_d -T _d (11)
55–69	0,06–0,08	53	64	Π_d -T _d P(CNEt)
70–77	0,08–0,088	3	3,6	Π_d -T _d P(CNEt)
110–120	0,125–0,135	3	3,6	Π_d -T _d P (15)
121–133	0,135–0,155	9	11	(CNEt) <i>p</i> Π_d -T _d P(CNEt)

Dann wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1 × 35 cm), Hydrogencarbonatform, gegeben. Elutionsgradient: Mischgefäß: 3 l H₂O; Vorratsgefäß: 3 l 0,3 M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Die Fraktionengruppen wurden je mit 25proz. Ammoniak 24 Std. bei 23° stehengelassen (Entfernung der β -Cyanoäthylgruppe). Die geringen Verunreinigungen, die das Dinucleotid begleiteten, wurden mittels präparativer Papierchromatographie (Whatman No. 3 MM, Fließmittel L) entfernt. Die Ausbeute an Π_d -T_dP (15) betrug 71%.

Π_d -T_dP (15) wies im UV. Maxima bei 303 und 264 nm auf, war papierchromatographisch (Fließmittel L und K) und im DC. (Fließmittel A und B resp. C) einheitlich. Milz-Phosphodiesterase spaltete das Dinucleotid 15 vollständig in Π_d P (13) und T_dP, alkalische Phosphatase in Π_d -T_d (11); mit rohem Schlangengift trat keine Spaltung ein.

11. Π_d -T_d(Ac) (18) aus (MeOTr) Π_d -T_d (9). – Eine Lösung von 39 mg (0,05 mmol, 320 OD₃₀₃-Einheiten) 9 in je 2 ml Pyridin wurde 2mal eingedampft und der Rückstand mit 5 ml Pyridin/Acetanhydrid 4:1 16 Std. bei 35° stehengelassen. Dann wurde 3 Std. bei 23° mit 4 ml Wasser (das unter Kühlen mit Eis zugegeben wurde) hydrolysiert, das Gemisch zur Trockne eingedampft und mit 5 ml Eisessig/Pyridin 7:3 während 25 Min. auf 100° erhitzt (Entfernung der *p*-Methoxytritylgruppe). Nach Eindampfen wurde der Rückstand in 40 ml Wasser aufgenommen, 2mal mit je 20 ml 2-Butanol ausgeschüttelt und die organischen Phasen 2mal mit je 5 ml Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen, die das Π_d -T_d(Ac) (18) enthielten, wurden eingedampft und der Rückstand durch 3maliges Eindampfen seiner Lösung in je 10 ml Pyridin getrocknet. Das so gewonnene «rohe» 18 wurde für weitere Synthesen verwendet (Versuche 12.1; 12.2).

Für den Versuch 13 wurde das rohe 18 wie folgt gereinigt: Eine Lösung von 16,1 mg (0,02 mmol, 130 OD₃₀₃-Einheiten) (MeOTr) Π_d -T_d (9) wurde in Π_d -T_d(Ac) (18) durch die oben erwähnte Reaktionssequenz übergeführt. Das gewonnene Material wurde wie oben beschrieben getrocknet und mit 50 ml Petroläther ausgewaschen (Entfernung des *p*-Methoxytritylalkohols). Der trockene Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1 × 35 cm), Acetatform, gegeben. Elutionsgradient: Mischgefäß: 2 l H₂O; Vorratsgefäß: 2 l 0,075 M CH₃COONH₄; Fraktionengrösse: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient × M CH ₃ COONH ₄ × =	OD ₃₀₃ -Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf einge- setztes (MeOTr) Π_d -T _d (9)	Substanz
2	0,00	5	4,1	Π_d (3)
27–38	0,01–0,016	108	90	Π_d -T _d (Ac) (18)
39–48	0,016–0,02	8	6	Π_d -T _d (Ac) + wenig Nebenprodukt

Das Ammoniumacetat wurde durch Sublimation bei 37° und 0,07 Torr entfernt. Das so bereitete Π_d -T_d(Ac) (18) war im DC. (Fließmittel A und B) einheitlich.

12. $p\Pi_d$ -T_d (19) aus rohem Π_d -T_d(Ac) (18). – 12.1. Mit TPS. 295 OD₃₀₃-Einheiten (0,05 mmol) von rohem 18 wurden dem vorgetrockneten Eindampfrückstand von 0,15 ml (0,15 mmol) der Stammlösung der β -Cyanoäthylphosphorsäure, in 3 ml Pyridin hinzugefügt. Das Gemisch wurde nochmals durch Eindampfen seiner Lösung in 3 ml Pyridin getrocknet, dann 100 mg (0,33 mmol) TPS zugegeben, das Gemisch in 1 ml Pyridin gelöst und 6 Std. bei 23° stehengelassen. Nach Versetzen mit 1,5 ml Wasser unter Eiskühlung wurde 14 Std. bei 23° und nach Zugabe von 25 ml 25proz. Ammoniak weitere 24 Std. bei 23° stehengelassen (Abspaltung der Acetyl- und β -Cyanoäthyl-Gruppe). Nach Eindampfen wurde das Gemisch in 50 ml Wasser aufgenommen und 2mal mit 30 ml 2-Butanol ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden 2mal mit je 3 ml Wasser gewaschen.

Die wässrigen Phasen wurden auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1 × 35 cm), Hydrogencarbonatform, gegeben. Elutionsgradient: Mischgefäß: 2 l H₂O; Vorratsgefäß: 2 l 0,02 M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient $\approx M NH_4HCO_3$ $\approx =$	OD ₂₀₃ -Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf eingesetztes $II_d-T_d(18)$	Substanz
13–25	0,015–0,03	63	21,3	II_d-T_d (11)
57–68	0,06–0,07		14	p T_d
104–119	0,115–0,14	72	24,4	p II_d-T_d (19)
120–130	0,14–0,15	7,5	2,6	p II_d-T_d (19)

Die Ausbeute an p II_d-T (19) betrug 27%.

12.2. Mit DCCI. Zum vorgetrockneten Eindampfrückstand von 0,1 ml (0,1 mmol) der Stammlösung der β -Cyanoäthylphosphorsäure, wurden 120 OD₂₀₃-Einheiten (0,02 mmol) rohes $II_d-T_d(18)$ gegeben, das Gemisch durch 3maliges Eindampfen seiner Lösung in je 2 ml Pyridin getrocknet und in 1 ml Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 495 mg (2,5 mmol) DCCI wurde das Gemisch 48 Std. unter zeitweisem Schütteln stehengelassen, danach mit 1 ml Wasser unter Eiskühlung versetzt und 14 Std. bei 23° stehengelassen, weiter mit 10 ml Wasser/Pyridin 1:1 versetzt und filtriert. Der Rückstand (hauptsächlich Dicyclohexylharnstoff) wurde mit 10 ml des gleichen Gemischs 3mal gewaschen. Das Filtrat wurde 3mal mit je 30 ml Äther ausgeschüttelt und die Ätherphase 2mal mit je 3 ml Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden eingedampft und mit 10 ml 25proz. Ammoniak 24 Std. bei 23° stehengelassen (Entfernung der Acetyl- und β -Cyanoäthyl-Gruppe). – Dann wurde eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1 $\times$ 35 cm), Hydrogencarbonatform, gegeben. Elutionsgradient: Mischgefäß: 2 l H₂O; Vorratsgefäß: 2 l 0,2 M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient $\approx M NH_4HCO_3$ $\approx =$	OD ₂₀₃ -Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf eingesetztes $II_d-T_d(18)$	Substanz
15–25	0,015–0,03	57	47,5	II_d-T_d (11)
56–62	0,065–0,075	6	5	(CNEt)p II_d-T_d
63–72	0,075–0,085	9	7,5	(CNEt)p II_d-T_d + (20)
100–110	0,115–0,125	43	35,8	p II_d-T_d (19)
111–120	0,125–0,14	5	4,2	p II_d-T_d (19)

Das Material der Fraktionen Nr. 56–72 wurde zusätzlich mit 10 ml 25proz. Ammoniak 24 Std. bei 23° stehengelassen. Mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie (Whatman No. 3MM, Fließmittel L) wurden zusätzlich 8% p II_d-T_d (19) sowie 3,5% des Dinucleotid-Derivats 20 gewonnen. Die Gesamtausbeute an p II_d-T_d (19) betrug 48%.

13. p II_d-T_d (19) aus gereinigtem $II_d-T_d(18)$. – Zum vorgetrockneten Eindampfrückstand von 0,1 ml (0,1 mmol) der Stammlösung von β -Cyanoäthylphosphorsäure, wurden 108 OD₂₀₃-Einheiten (0,018 mmol) chromatographisch gereinigtes 18 gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde durch 3maliges Eindampfen seiner Lösung in je 2 ml Pyridin getrocknet, in 1 ml Pyridin gelöst, 430 mg (2,15 mmol) DCCI beigelegt und 96 Std. bei 23° stehengelassen. Dann wurde unter Eiskühlung mit 1 ml Wasser versetzt und 5 Std. bei 23° stehengelassen, dann 10 ml Wasser/Pyridin 1:1 zugegeben und filtriert. Der Rückstand (hauptsächlich Dicyclohexylharnstoff) wurde noch 4mal mit je 5 ml des gleichen Gemischs nachgewaschen, das Filtrat 3mal mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt und die Ätherphasen 2mal mit je 3 ml Wasser gewaschen. Die

wässrige Phase wurde eingedampft und mit 10 ml 25proz. Ammoniak 10 Std. bei 23. stengelassen (Entfernung der Acetyl- und β -Cyanoäthylgruppe).

Nach Eindampfen wurde der trockene Rückstand in Wasser aufgenommen und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (1 $\times$ 35 cm), Hydrogencarbonatform, gegeben. Elutionsgradient: Mischgefäß: 2 l H₂O; Vorratsgefäß: 2 l 0,2M NH₄HCO₃; Fraktionengrösse: 23 ml; Durchflussgeschwindigkeit: 1,5 ml/Min.

Fraktion Nr.	Gradient $\times$ M NH ₄ HCO ₃ $\times$ =	OD ₃₀₂ -Einheiten	Ausbeute in % bezogen auf eingesetztes II _a -T _a (Ac) (18)	Substanz
17–32	0,02–0,036	34,5	32	II _a -T _a (11)
65–83	0,075–0,095	21,5	20	(CNEt)pII _a -T _a + (20)
113–131	0,125–0,15	52	48	pII _a -T _a (19)

Das Material der Fraktionen Nr. 65–83 wurde zusätzlich mit 5 ml 25proz. Ammoniak 24 Std. bei 23° stengelassen (Entfernung der β -Cyanoäthylgruppe). Mit Hilfe der präp. Papierchromatographie (Whatman No. 3MM, Fließmittel L) wurden zusätzlich 12% pII_a-T_a (19) sowie 8% des Dinucleotid-Derivats 20 gewonnen. Die Gesamtausbeute an 19 betrug 60%. Das Dinucleotid 19 wies im UV. Maxima bei 303 und 264 nm auf, war papierchromatographisch (Fließmittel L und K) und im DC. (Fließmittel A und B resp. C) einheitlich. 19 wurde durch Schlangengift-Phosphodiesterase in pII_a und pT_a, durch rohes Schlangengift in II_a und T_a, durch alkalische Phosphatase zu II_a-T_a (11) gespalten.

14. Tabelle 3. Übersicht über die durchgeführten Versuche

Synthese von (MeOTr)II_a-T_a (9)

(MeOTr)II _a (4)	pT _a (Ac) (5)	TPS	Molare Konz. von 4	Ausbeute an 9
1 ^{a)}	1 ^{a)}	5 ^{a)}	0,05	54%
1	1	6	0,2	50%
1	1,1	5	0,1	54%
1	1	4	0,1	55% ^{b)}
DCC				
1	1,1	6,5 ^{a)}	0,03	61%
1	1,3	5 ^{a)}	0,05	56%
1	1	9	0,05	66%
1	2	11	0,044	69%

Synthese von II_ap (13)

(MeOTr)II _a (4)	β -Cyanoäthyl- phosphorsäure	TPS	Molare Konz. von 4	Ausbeute an 13
1	3	5	0,05	86% ^{a)}
1	3	6	0,03	82%
DCC				
1	3	10	0,05	71%
1	5	25	0,045	75%

Synthese von II_d - T_d p (15)

(MeOTr) II_d - T_d (9)	β -Cyanoäthylphosphorsäure	DCC	Molare Konz. von 9	Ausbeute an 15	an 16
1	4	100	0,03	67%	3%
1	10	200	0,014	71%	–
1	6	180	0,016	60%	8%

Synthese von pII_d - T_d (19)

II_d - T_d (Ac) (18)	β -Cyanoäthylphosphorsäure	TPS	Molare Konz. von 18	Ausbeute an 19	an 20
1	2	6	0,05	22%	
1	3	6	0,05	27%	
		DCC			
1 ^{e)}	5	250	0,02	48%	3,5%
1 ^{f)}	6	100	0,017	60%	8%
1 ^{f)}	7	150	0,013	57% ^{g)}	14%

a) Anzahl Äquivalente. b) Reaktion bei -18° . c) Zusatz von Pyridinium-Dowex. d) Die Auftrennung des Reaktionsgemisches erfolgte papierchromatographisch (Whatman No. 3, Fließmittel A). e) Rohes II_d - T_d (Ac). f) Gereinigtes II_d - T_d (Ac). g) Reaktionsdauer 9 Tage.

15. Tabelle 4. *R_f-Werte der Dünnschicht- und Papierchromatogramme*

Substanz	Dünnschichtchromatogramme										Papierchromatogramme		
	Fließmittel										Fließmittel		
	A	B	C	D	E	F	H	I	J		A	K	L
(MeOTr) II_d (4)	0,8					0,5							
II_d (3)						0,1	0,24					0,55	
II_{dp} (13)	0,25	0,41									0,28	0,069	0,39
pII_d	0,20	0,37							0,09				
T_{dp}	0,24	0,4											
pT_d	0,19	0,36		0,23	0,56						0,065	0,035	0,23
pT_d (Ac) (5)	0,22	0,44		0,39									
$T_d5'pp5'T_d$ (12)	0,47										0,11	0,057	0,26
II_d - T_d (11)	0,51	0,41	0,3		0,76			0,44	0,106		0,51	0,345	0,59
II_d - T_d (Ac) (18)	0,56	0,47											
(MeOTr) II_d - T_d (9)	0,66							0,57	0,186		0,74	0,62	
(MeOTr) II_d - T_d (Ac) (7)	0,69												
(MeOTr) II_d - T_{dp} (14)	0,3										0,21	0,06	0,57
II_d - T_{dp} (15)	0,18	0,27	0,13								0,13	0,02	0,217
pII_d - T_d (19)	0,18	0,27	0,13		0,55						0,14	0,026	0,23
pII_d - T_{dp} (17)	0,01												0,08
2(1H)-Pyridon	0,7						0,37				0,75		
(MeOTr) II_{dp} (CNEt)	0,71												
II_{dp} (CNEt)	0,6												
(MeOTr) II_{dp}	0,49												
(MeOTr) II_d - T_{dp} (CNEt)	0,49												
II_d - T_{dp} (CNEt)	0,45												
(CNEt) pII_d - T_d	0,44												
(CNEt) pII_d - T_{dp} (CNEt)	0,42												

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] U. Séquin, *Helv.* **57**, 68 (1974).
- [2] U. Séquin & Ch. Tamm, *Helv.* **55**, 1196 (1972).
- [3] P. T. Gilham & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 6212 (1958).
- [4] G. Weimann & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 419 (1962).
- [5] R. L. Letsinger & K. K. Ogilvie, *J. Amer. chem. Soc.* **91**, 3350 (1969).
- [6] T. M. Jacob & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 1630 (1964).
- [7] R. Lohrmann & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 829 (1966).
- [8] H. G. Khorana, *Pure appl. Chemistry* **17**, 349 (1968); K. L. Agarwal, A. Yamazaki, P. J. Cashion & H. G. Khorana, *Angew. Chem.* **84**, 489 (1972).
- [9] H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 3821 (1963).
- [10] W. Falk & Ch. Tamm, *Helv.* **55**, 1928 (1972).
- [11] A. M. Michelson & A. R. Todd, *J. chem. Soc.* **1955**, 2632.
- [12] T. M. Jacob & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 368 (1965).
- [13] H. G. Khorana, J. P. Vizsolyi & R. K. Ralph, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 414 (1962).
- [14] A. F. Turner & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 4651 (1959).
- [15] H. Kössel, M. W. Moon & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 2148 (1967).
- [16] T. M. Jacob & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 2971, (1965); S. A. Narang & H. G. Khorana, *ibid.* **87**, 2981 (1965); S. A. Narang, T. M. Jacob & H. G. Khorana, *ibid.* **87**, 2988 (1965).
- [17] H. Schaller & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 3828 (1963).
- [18] G. M. Tener, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 159 (1961).
- [19] H. G. Khorana, A. F. Turner, J. P. Vizsolyi, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 686 (1961).
- [20] G. M. Tener, H. G. Khorana, R. Markham & E. H. Pol, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 6223 (1958).
- [21] R. K. Ralph & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 2926 (1961).
- [22] S. A. Narang, T. M. Jacob & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 2167 (1967).
- [23] P. J. Cashion, M. Fridkin, K. L. Agarwal, E. Jay & H. G. Khorana, *Biochemistry* **12**, 1985 (1973).
- [24] R. Glaser, U. Séquin & Ch. Tamm, *Helv.* **56**, 654 (1973).
- [25] F. Waldmeier, unveröffentlichte Versuche.
- [26] H. Kössel, H. Büchi & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 2185 (1967).

84. The Optical Activity of the Amide Chromophore, I. MO-Theoretical Calculation of the Long-Wavelength Optical Activity of γ -Lactams and of Related Isoelectronic Molecules

by Rudolf E. Geiger and Georges H. Wagnière

Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Zürich, CH-8001 Zürich

(28. I. 75)

Summary. The rotational strength of the longest-wavelength electronic transition in some simple γ -lactams and some related isoelectronic molecules is calculated using the CNDO-CI method. Qualitative agreement with experimental values is obtained. In all investigated systems the long-wavelength transition corresponds to the $n\pi^*$ transition. A quadrant rule seems to hold for this transition.

I. Introduction. - The amide chromophore is of particular interest, as it is the smallest subunit from which the chiroptic properties of polypeptides and proteins may be interpreted. For some general reviews see ref [1-3]. Litman & Schellman [4] appear to have been the first to measure the $n \rightarrow \pi^*$ Cotton effect in a simple amide.