

Synthese von Oligo- und Polynucleotiden, VIII¹⁾

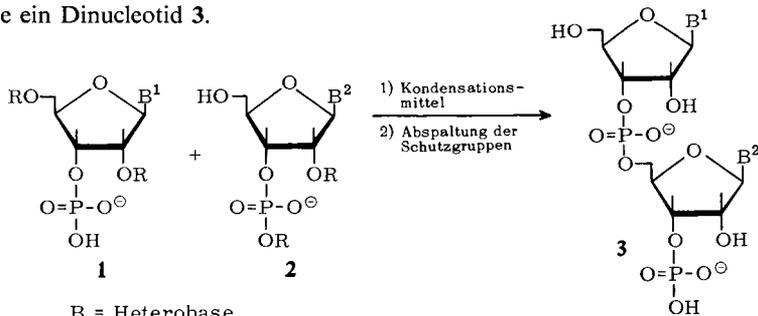
Synthese von Dinucleotiden der Ribose-Reihe mit terminaler 3'-Phosphat-Gruppe

von Hans-Jürgen Rhaese, Wolfgang Siehr und Friedrich Cramer

Aus dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Chemische Abteilung, Göttingen
Eingegangen am 15. Oktober 1966

Bei der Kondensation von acylierten Ribomononucleotiden mit freier 3'-Phosphat-Gruppe (Nucleotid-Komponente) und Tetraäthylammoniumsalzen von Nucleosid-2'.3'-cyclophosphaten mit freier 5'-Hydroxy-Gruppe (Nucleosid-Komponente) entstehen, nach enzymatischer Hydrolyse der 2'.3'-Cyclophosphate und Abspaltung der Alkali-labilen Schutzgruppen, folgende Dinucleotide in Ausbeuten von 20–40% d. Th.: Adenylyl-(3' → 5')-uridin-3'-phosphat, -cytidin-3'-phosphat und -guanosin-3'-phosphat; Uridylyl-(3' → 5')-uridin-3'-phosphat, -cytidin-3'-phosphat und -guanosin-3'-phosphat; Cytidylyl-(3' → 5')-uridin-3'-phosphat, -guanosin-3'-phosphat und -cytidin-3'-phosphat. Kondensationsmittel ist in allen Fällen Dicyclohexylcarbodiimid.

Die chemische Synthese von Ribodinucleotiden mit spezifischer (3' → 5')-Internucleotid-Bindung beruht auf der Kondensation eines geschützten Mononucleotides **1** mit freier 3'-Phosphat-Gruppe und eines ebenfalls geschützten Mononucleotides **2** mit freier 5'-Hydroxy-Gruppe. Nach Abspaltung der Schutzgruppen erhält man auf diese Weise ein Dinucleotid **3**.



Von den *Kondensationsmitteln*^{1a,2)} für die (3' → 5')-Verknüpfung von Ribooligonucleotiden, d. h. zur Synthese von unsymmetrischen Diestern der Phosphorsäure, verwenden wir vornehmlich Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)³⁾.

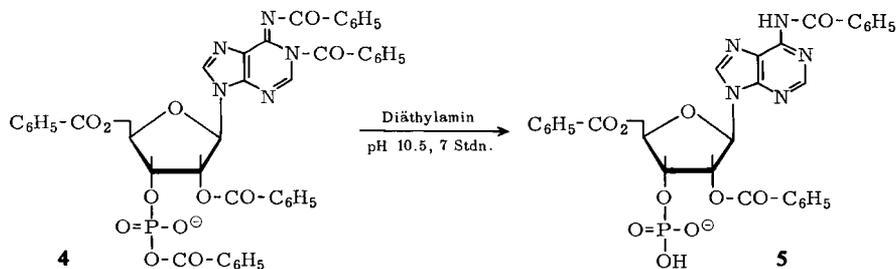
1) 1a) VII. Mitteilung: F. Cramer, *Angew. Chem.* **78**, 186 (1966). – 1b) VI. Mitt.: F. Cramer, K.-H. Scheit und H.-J. Rhaese, *Liebigs Ann. Chem.* **693**, 244 (1966).

2) H. G. Khorana, *Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest*, J. Wiley & Sons Inc., New York 1961, S. 99.

3) H. G. Khorana und A. R. Todd, *J. chem. Soc. [London]* **1953**, 2257.

Über die verschiedenen Möglichkeiten zur Darstellung spezifisch geschützter Ribomononucleotide mit freier 3'-Phosphat-Gruppe, die als Nucleotid-Komponente für die Knüpfung der (3' → 5')-Internucleotid-Bindung geeignet sind, wurde bereits ausführlich berichtet⁴).

In der vorliegenden Arbeit werden sowohl zum Schutz der 5'- und 2'-Hydroxy-Gruppen als auch der Nucleobasen in Ribomononucleotiden *Acyl-Schutzgruppen* (Acetyl, Benzoyl) verwendet⁵⁻⁷). Sie haben, besonders gegenüber der in 2'-Stellung befindlichen Tetrahydropyranyl-Schutzgruppe^{4, 8, 9}), den Vorteil der leichten Abspaltbarkeit in alkalischem Medium, wobei eine Isomerisierung der Internucleotid-Bindung (von 3' → 5' nach 2' → 5') nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß stattfindet. Die Ribonucleosid-3'-phosphate können mit Acylchlorid^{10, 11}) oder Acylanhydrid⁵) acyliert werden. Bei der Benzoylierung der Tetraäthylammoniumsalze des 3'-AMP mit Benzoylchlorid in Pyridin entsteht vorwiegend das *N1, N6, O2', O5'*-Tetrabenzoyl-adenosin-3'-phosphorsäure-benzoesäure-anhydrid (**4**), das nach Hydrolyse mit wäßrigem Diäthylamin/Dioxan (1 : 1) bei pH 10.5 das *N6, O2', O5'*-Tribenzoyl-adenosin-3'-phosphat (**5**) liefert. Hierbei ließ sich aber eine Cyclisierung zum *N6, O5'*-Dibenzoyl-adenosin-2'.3'-cyclophosphat (15 %) nicht ganz vermeiden. Die Acetylierung und auch die Benzoylierung von Nucleosid-3'-phosphaten mit den Anhydriden dieser Säuren verläuft jedoch in Gegenwart von Tetraäthylammoniumsalzen der Essig- bzw. Benzoesäure ohne Cyclisierung und auch ohne feststellbare Isomerisierung⁵).



Während bei der Synthese von Dinucleosidphosphaten quantitative Ausbeuten erreicht worden sind¹²), konnten wir^{1, 13}) Ribodinucleotide mit freier, endständiger 3'-Phosphat-Gruppe in nur relativ niedrigen Ausbeuten erhalten. Der Grund hierfür ist zum Teil im Fehlen geeigneter Schutzgruppen für die endständige 3'-Phosphat-

4) F. Cramer, H.-J. Rhaese, S. Rittner und K.-H. Scheit, *Liebigs Ann. Chem.* **683**, 199 (1965).

5) D. H. Rammner, J. Lapidot und H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 1989 (1963).

6) J. Lapidot und H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 3852 (1963).

7) J. Lapidot und H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 3857 (1963).

8) M. Smith, D. H. Rammner, I. H. Goldberg und H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 430 (1962).

9) J. Smrt und F. Šorm, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **27**, 83 (1962).

10) H.-J. Rhaese, Dissertation Techn. Hochschule Darmstadt 1964.

11) W. Siehr, Diplomarbeit Techn. Hochschule Darmstadt 1965.

12) R. Lohrmann und H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 4188 (1964).

13) F. Cramer und K.-H. Scheit, *Liebigs Ann. Chem.* **679**, 150 (1964).

Gruppe von Ribomononucleotiden zu suchen. Diese Schwierigkeit kann durch Verwendung der Ribonucleosid-2'.3'-cyclophosphate umgangen werden.

Es gibt zwar eine Reihe anderer Phosphat-Schutzgruppen (z. B. β -Cyan-äthyl¹⁴⁾, Benzyl¹⁵⁾, *p*-Nitro-phenyl¹⁶⁾, tert.-Butyl¹⁷⁾ und Benzhydryl-Gruppe^{13, 18)} sowie verschiedene Alkohole [z. B. 1-Cyanmethyl-äthanol oder 1-Hydroxy-2-methyl-butanon-(3)] die, mit einem Ribomononucleotid verestert, die Phosphatgruppe vor unerwünschten Reaktionen bei der Dinucleotid-Synthese schützen¹⁹⁾. Alle diese Phosphat-Schutzgruppen, mit Ausnahme der Benzhydrylgruppe, haben jedoch den Nachteil, daß bei Ribonucleotiden die 2'-Hydroxy-Gruppe ebenfalls geschützt werden muß. Eine Isomerisierung ist aber, selbst bei Anwesenheit einer Schutzgruppe in 2'-Stellung, nicht immer ausgeschlossen¹⁹⁾.

Die Methode, Ribonucleosid-2'.3'-cyclophosphate als Nucleotid-Komponente bei der Darstellung von Alkylestern bzw. Di- und Oligonucleotiden zu verwenden, ist bekannt^{20, 21)}. Hierbei erhält man aber neben der (3' \rightarrow 5')- auch eine (2' \rightarrow 5')-Internucleotid-Bindung. *Smrt* und *Šorm*⁹⁾ bedienten sich bei der Synthese eines geschützten Pyrimidinribonucleosides der Tatsache, daß Ribonuclease Ribonucleosid-2'.3'-cyclophosphate spezifisch zu Nucleosid-3'-phosphaten hydrolysiert; sie verwendeten dieses Enzym auch, um Dinucleotide mit endständigem 3'-Phosphat darzustellen²²⁾. Von *Söll* und *Khorana*²³⁾ wurde ein ähnlicher Weg zur Darstellung von Dinucleotiden beschritten.

Syntheseverfahren

Es gelang nun, Nucleosid-2'.3'-cyclophosphate mit freier 5'-OH-Gruppe direkt als Nucleosid-Komponente bei der Synthese der (3' \rightarrow 5')-Internucleotid-Bindung zu verwenden. Da das Pyridiniumsalz von Nucleosid-2'.3'-cyclophosphaten in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid/Pyridin nach 3 Tagen bei 20° ein Gemisch aus Nucleosid-2'- und -3'-phosphaten lieferte, wie chromatographisch festzustellen war, verwendeten wir für die Synthese von Dinucleotiden das Tetraäthylammoniumsalz, das unter den Reaktionsbedingungen stabil ist.

Geschützte Ribonucleosidmonophosphate mit freier 3'-Phosphat-Gruppe

Sie wurden hauptsächlich nach der von *Khorana* und Mitarbeitern⁵⁻⁷⁾ beschriebenen Methode dargestellt. Die Acylierung der Ribonucleosidmonophosphate **6** zu **7** mit Acetanhydrid bzw. Benzoessäureanhydrid in Gegenwart der Tetraäthylammoniumsalze der entsprechenden Säuren verlief in nahezu quantitativer Ausbeute und ohne Isomerisierung.

14) *G. M. Tener*, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 159 (1961).

15) *A. F. Turner* und *H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 4651 (1959).

16) *J. Baddiley* und *A. R. Todd*, *J. chem. Soc. [London]* **1947**, 648.

17) *F. Cramer*, *H. Neunhoeffer*, *K.-H. Scheit*, *G. Schneider* und *J. Tennigkeit*, *Angew. Chem.* **74**, 387 (1962); *Angew. Chem., internat. Edit.* **1**, 331 (1962).

18) *F. Cramer*, *H. P. Bär*, *H.-J. Rhaese*, *W. Saenger*, *K.-H. Scheit*, *G. Schneider* und *J. Tennigkeit*, *Tetrahedron Letters [London]* **1963**, 1039.

19) *D. Söll* und *H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 360 (1965).

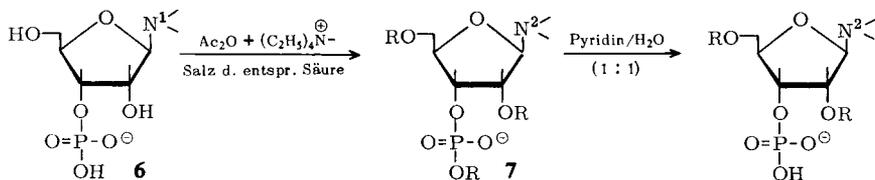
20) *C. A. Dekker* und *H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 3522 (1954).

21) *A. M. Michelson*, *Nature [London]* **181**, 303 (1958).

22) *J. Smrt* und *F. Šorm*, *Collect. czechoslov. chem. Commun.* **28**, 2415 (1963).

23) *D. Söll* und *H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 350 (1965).

Das bei der *Acetylierung* entstehende Di- bzw. Triacetyl-ribonucleosidmonophosphorsäure-essigsäure-anhydrid ließ sich in wäßrigem Pyridin innerhalb von 1–3 Stdn. bei Raumtemperatur zum Di- bzw. Triacetyl-ribonucleosidmonophosphat **8** hydrolysieren, ohne daß die anderen Acetyl-Schutzgruppen in Mitleidenschaft gezogen wurden.



8a: $\text{N}^{2<} = \text{N}^6$ -Benzoyl-adenin

b: $\text{N}^{2<} = \text{Uracil}$

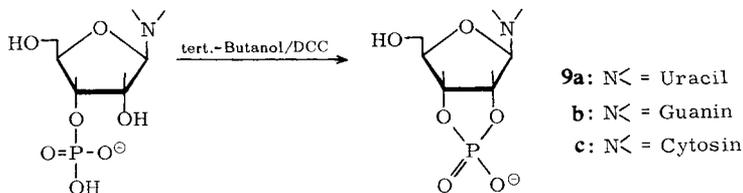
c: $\text{N}^{2<} = \text{N}^6$ -Acetyl-cytosin

Bei der *Benzoylierung* der Ribomononucleotid-pyridiniumsalze mit Benzoesäure-anhydrid in Gegenwart von Tetraäthylammonium-benzoat erhielten wir Di-, Tri- oder Tetrabenzoyl-ribonucleosidphosphorsäure-benzoesäure-anhydride. Die Hydrolyse der Phosphorsäure-benzoesäure-anhydride ohne gleichzeitige Abspaltung der Benzoyl-Schutzgruppen war nicht möglich. Es besteht aber die Möglichkeit, das Phosphorsäure-benzoesäure-anhydrid durch Umacylierung mit Acetanhydrid in das Phosphorsäure-essigsäure-anhydrid zu verwandeln und dieses in wäßrigem Pyridin zum freien Phosphat **8** zu hydrolysieren.

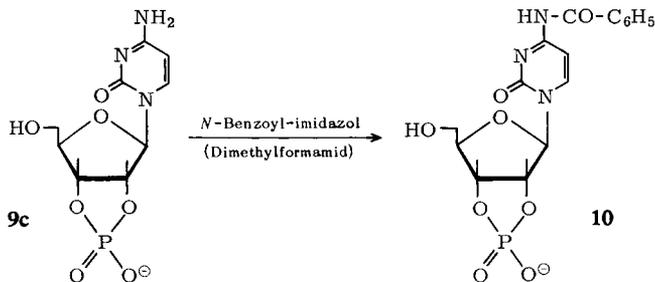
Aus den Ditetraäthylammoniumsalzen der Ribonucleosidmonophosphate entstand mit Benzoylchlorid/Pyridin das benzoylierte Nucleosidphosphorsäure-benzoesäure-anhydrid nur in geringer Menge. Die auftretende Cyclisierung verhindert auch hier die Darstellung eines einheitlichen Produktes.

Tetraäthylammoniumsalze von Ribonucleosid-2'.3'-cyclophosphaten und deren *N*-Benzoylierung

Die Cyclisierung des Isomergemisches der 2'(3')-Ribonucleosidmonophosphate wurde nach der Vorschrift von *Smrt* und *Šorm*⁹⁾ durchgeführt, wobei aber länger (6 Stdn.) unter Rückfluß gekocht wurde. Die erhaltenen Ammoniumsalze **9** der Ribonucleosid-2'.3'-cyclophosphate wurden mittels Ionenaustauschers (Merck I, Tetraäthylammonium-Form) in die Tetraäthylammoniumsalze übergeführt.

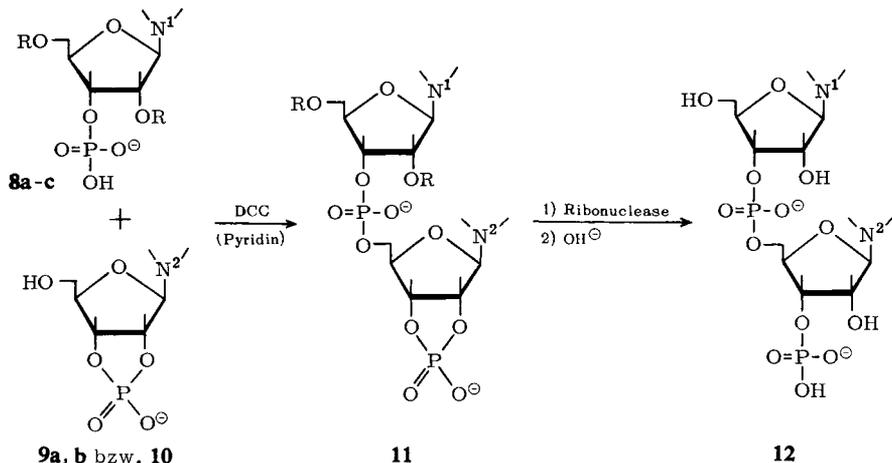


Die Verwendung der Tetraäthylammoniumsalze von Ribonucleosid-2'.3'-cyclophosphaten als Nucleosid-Komponente bei Dinucleosid-Synthesen ist im Falle von Uridin-2'.3'-cyclophosphat einfach, da die Nucleobase (Uracil) keine weiteren zu schützenden funktionellen Gruppen enthält. Cytidin-2'.3'-cyclophosphat als Nucleosid-Komponente hingegen erfordert den Schutz der primären Aminogruppe der Nucleobase. Sie gelingt selektiv durch *N*-Benzoylierung mit Hilfe von *N*-Benzoyl-imidazol²⁴⁾. Auch das Cytidin-2'.3'-cyclophosphat ließ sich auf diese Weise in absol. Dimethylformamid (DMF) nahezu quantitativ in das *N*⁶-Benzoyl-cytidin-2'.3'-cyclophosphat (**10**) überführen. Dieses ist nun als Nucleosid-Komponente für Dinucleosid-Synthesen geeignet.



Ribodinucleotide

Durch Kondensation der mit Acetyl- bzw. Benzoylgruppen geschützten Ribonucleosidmonophosphate **8a–c** mit Tetraäthylammonium-ribonucleosid-2'.3'-cyclophosphaten (**9a, b** oder **10**) in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid/absol. Pyridin,



²⁴⁾ J. Tennigkeit, Dissertation Techn. Hochschule Darmstadt 1964.

nachfolgende enzymatische Spaltung der entstandenen geschützten Nucleotidyl-nucleosid-2',3'-cyclophosphate **11** und alkalische Hydrolyse der Schutzgruppen erhält man die Dinucleotide **12** in Ausbeuten von 20–42% d. Th. (vgl. Tab. 1).

Tabelle 1. Dargestellte Ribodinucleotide

Dinucleotid	% Ausbeute	R_F -Wert in Gemisch *)				% Enzymat. Spaltung
		A	B	C	D	
Adenylyl-(3' → 5')-uridin-3'-phosphat	20–38%	0.05	0.04	0.31	—	95%
Adenylyl-(3' → 5')-cytidin-3'-phosphat	10–20	0.05	—	0.30	0.22	90
Adenylyl-(3' → 5')-guanosin-3'-phosphat	25–30	0.04	—	0.28	—	90
Uridylyl-(3' → 5')-uridin-3'-phosphat	15	0.04	—	0.30	—	90–95
Uridylyl-(3' → 5')-cytidin-3'-phosphat	10–25	—	—	0.27	0.20	90–95
Uridylyl-(3' → 5')-guanosin-3'-phosphat	31	—	—	0.28	—	90–95
Cytidylyl-(3' → 5')-cytidin-3'-phosphat	22	0.04	0.05	0.29	—	90–95
Cytidylyl-(3' → 5')-uridin-3'-phosphat	42	0.04	0.05	0.31	0.17	90–95
Cytidylyl-(3' → 5')-guanosin-3'-phosphat	15	0.05	—	0.31	—	90–95

*) Nähere Angaben im Versuchsteil S. 221.

Die Abtrennung der Dinucleotide erfolgt in den meisten Fällen papierchromatographisch (System: Isopropylalkohol/Ammoniak/Wasser = 7:1:2) oder durch Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose mit einem linearen Gradienten von Triäthylammonium-hydrogencarbonat (pH 7.8).

Die Dinucleotide lassen sich meist — z. T. nach vorheriger Abspaltung der endständigen Phosphatgruppe mit Alkaliphosphatase — mit Milz-Phosphodiesterase bzw. Ribonuclease nahezu quantitativ in die entsprechenden *Mononucleotide* spalten.

Wir danken Frau H. Gladosch für wertvolle Mithilfe. Die Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* unterstützt.

Beschreibung der Versuche

Pyridin wurde mit Calciumhydrid oder einem Molekularsieb getrocknet. — Zum *Eindampfen der Lösungen* dienten Vakuumrotationsverdampfer (Fa. Büchi); die Kühlschlangen hat man mit einem Kryomaten auf 0° und die Vorlage mit Methanol/Trockeneis gekühlt. Zum *Trocknen* wurden die Substanzen mehrmals mit absol. Pyridin i. Hochvak. eingedampft.

Papierchromatographie: Als *Fließmittel* dienten *A*: Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser (7 : 1 : 2); *B*: Äthanol/1 *n* Ammoniumacetat (5 : 2); *C*: *n*-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (55 : 10 : 35); *D*: Isobuttersäure/konz. Ammoniak/Wasser (66 : 1 : 33). Verwendet wurde das *Papier* Schleicher & Schüll Nr. 2043 b (gewaschen). *R_F*-Werte in den Tabellen 1 (S. 220) und 2.

Tabelle 2. *R_F*-Werte dargestellter Nucleosidphosphate

Substanz	<i>R_F</i> -Wert in Gemisch		
	A	B	C
Adenosin-3'-monophosphat	0.16	0.24	0.37
Uridin-3'-monophosphat	0.15	0.31	0.39
Cytidin-3'-monophosphat	0.15	0.28	0.38
Guanosin-3'-monophosphat	—	—	0.31
Adenosin-2'.3'-cyclophosphat	0.41	—	—
Uridin-2'.3'-cyclophosphat	0.32	—	0.58
Cytidin-2'.3'-cyclophosphat	0.44	0.57	0.39
Guanosin-2'.3'-cyclophosphat	0.27	—	0.48
<i>N</i> ⁶ -Benzoyl-adenosin-3'-monophosphat	0.32	0.44	—
<i>N</i> ⁶ . <i>O</i> ^{2'} . <i>O</i> ^{5'} -Tribenzoyl-adenosin-3'-monophosphat	—	0.85	—
<i>N</i> ⁶ -Benzoyl- <i>O</i> ^{2'} . <i>O</i> ^{5'} -diacetyl-adenosin-3-monophosphat	—	0.78	—
<i>O</i> ^{2'} . <i>O</i> ^{5'} -Diacetyl-uridin-3-monophosphat	—	0.52	—
<i>N</i> ⁶ . <i>O</i> ^{2'} . <i>O</i> ^{5'} -Triacetyl-cytidin-3'-monophosphat	—	0.72	—

Enzymatische Hydrolysen. — a) *Mit Ribonuclease*: Das *Substrat* (10 optische Dichte-Einheiten) wurde nach vorheriger Gefriertrocknung in 0.3 ccm 0.05*m* *Tris-Puffer* (pH 7) gelöst und mit 50λ *Ribonuclease-Lösung* [0.5 mg pancreas ribonuclease, Worthington (Freehold/N. Y., U.S.A.), in 1 ccm desselben Puffers] versetzt. Nach 6—8stdg. Inkubation bei 37° wurde 1 Tropfen Eisessig zugegeben, die gesamte Lösung auf einen Papierbogen (Schleicher & Schüll Nr. 2043 b, gewaschen) aufgetragen und in einem der voranstehend genannten Lösungsmittel chromatographiert.

b) *Mit Milz-Phosphodiesterase*: Das *Substrat* (10 optische Dichte-Einheiten) wurde nach vorheriger Gefriertrocknung mit 0.3 ccm 0.5*n* Ammoniumacetat und 10λ *Milz-Phosphodiesterase-Lösung* (2 mg spleen phosphodiesterase, Worthington, in 1 ccm Wasser) versetzt. Nach 6—8stdg. Inkubation bei 37° wurde 1 Tropfen Eisessig zugegeben und die gesamte Lösung wie bei a) chromatographiert.

c) Mit *Alkaliphosphatase*: Das *Substrat* (10 optische Dichte-Einheiten) wurde nach vorheriger Gefriertrocknung mit 0.02 ccm 0.05*m* *Tris-Puffer* (pH 7.5) und 30 λ *Alkaliphosphatase-Lösung* (1.25 mg bacterial alkaline phosphatase, Worthington, in 1 ccm Wasser) versetzt. Nach 6stdg. Inkubation bei 37° wurde 1 Tropfen Eisessig zugegeben und die gesamte Lösung, wie bei a) angegeben, mit dem *Fließmittel A* chromatographiert. Der dem *Dinucleosidphosphat* entsprechende Fleck wurde ausgeschnitten, mit Wasser eluiert und dann zur enzymatischen Spaltung mit der *Diesterase* (s. unter b) verwendet.

Acylierungen

*N*⁶-*Benzoyl-O*^{2'}.*O*^{5'}-*diacetyl-adenosin-3'-phosphat*, *O*^{2'}.*O*^{5'}-*Diacetyl-uridin-3'-phosphat* und *N*⁶.*O*^{2'}.*O*^{5'}-*Triacetyl-cytidin-3'-phosphat* wurden nach Methoden von *Khorana* und Mitarbeitern^{5-8, 12, 19, 23}) dargestellt.

*N*⁶.*O*^{2'}.*O*^{5'}-*Tribenzoyl-adenosin-3'-phosphat* (5). — 347.23 mg (1 mMol) *3'-Adenylsäure* wurden mittels *Ionenaustauschers* (Merck I; Tetraäthylammonium-Form) in das *Tetraäthylammoniumsalz* übergeführt. Nach dem Trocknen wurde dieses mit 10 ccm absol. *Pyridin* und 1.5 ccm (1.3 mMol) *Benzoylchlorid* (frisch dest.) versetzt und 1 Stde. bei Raumtemperatur stengelassen. Danach setzte man unter Eiskühlung 10 ccm absol. Methanol hinzu, ließ weitere 2 Stdn. bei ca. 20° stehen und dampfte die Lösung i. Hochvak. so weit wie möglich ein. Die Lösung des Rückstands in Wasser/Dioxan wurde mit *Diäthylamin* auf pH 10.5 (pH-Meter) eingestellt. Nach 7 Stdn. bei Raumtemperatur wurde eingedampft, der Rückstand mit absol. *Pyridin* absolutiert, in 15 ccm absol. *Pyridin* gelöst und langsam in einen großen Überschuß von absol. Äther getropft. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator über P₂O₅ aufbewahrt. Ausbeute an 5 80–85% d. Th.; λ_{\max} = 280 und 234 m μ ; papierchromatographisch einheitlich (R_F = 0.85 in Gemisch B); elektrophoretische Beweglichkeit μ = 0.55 (bez. auf Adenosin-3'-monophosphat).

Nach *Hydrolyse* mit *Dioxan/Ammoniak* (1 : 1) ergab die Papierchromatographie (Gemisch A) 2 Flecke: Adenosin-2'.3'-cyclophosphat (10–15%) und 3'-Adenylsäure.

Nucleosid-2'.3'-cyclophosphate

Tetraäthylammoniumsalze. — Nach der von *Smrt* und *Šorm*⁹⁾ angegebenen Vorschrift wurden *Uridin-*, *Cytidin-* und *Guanosin-2'.3'-cyclophosphat* erhalten, wobei quantitative Cyclisierung erst nach 6–8stdg. Kochen unter Rückfluß erreicht war. Der Verlauf der Cyclisierung wurde dünnschichtchromatographisch (Polyäthylimin-cellulose, 0.3 *n* NaCl) verfolgt. Die nach der Aufarbeitung erhaltenen *Ammoniumsalze* (3 mMol) wurden, in 10 ccm Wasser gelöst, auf eine Säule (15 \times 2 cm) von *Ionenaustauscher Merck I* (*Tetraäthylammonium-Form*) gegeben, mit 95 ccm Wasser nachgewaschen und das Eluat eingedampft. Die Ausbeute an den *Tetraäthylammoniumsalzen* war nahezu quantitativ. Die chromatographisch reinen Substanzen (R_F -Werte in Tab. 2, S. 221) sind, bei 0° aufbewahrt, haltbar. Ihre UV-Spektren stimmen mit denen der Nucleosid-3'-monophosphate überein.

*N*⁶-*Benzoyl-cytidin-2'.3'-cyclophosphat* (10). — 642 mg (2 mMol) *Ammonium-cytidin-2'.3'-cyclophosphat* wurden in 200 ccm absol. Dimethylformamid zu 20 mMol *N-Benzoyl-imidazol* (im Rotationsverdampfer unter Feuchtigkeitsausschluß vom Benzol befreit) gegeben. Man ließ

gut verschlossen 5 Tage bei Raumtemperatur stehen, dampfte anschließend i. Hochvak. ein, löste den Rückstand in 20 ccm absol. Pyridin und tropfte die Lösung in einen Überschuß von kaltem, absol. Äther. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem, absol. Äther gewaschen, in 20-proz. wäßr. Äthanol gelöst und wie voranstehend in das *Tetraäthylammoniumsalz* übergeführt. Ausbeute 68.5% (582 mg, 1.37 mMol) **10**; Reinheitsgrad >95-proz., $\lambda_{\max} = 301, 257 \text{ m}\mu$; R_F -Werte in Tab. 2 (S. 221). Die Substanz enthält <5% (bez. auf **10**) *N*⁶.*O*^{5'}-Dibenzoyl-cytidin-2'.3'-cyclophosphat.

Dinucleotide

Allgemeines Verfahren: Als Nucleotid-Komponente dienen die *acylierten Nucleosidmonophosphate*, als Nucleosid-Komponente die *Nucleosid-2'.3'-cyclophosphate*. Sie wurden absolutiert, in absol. *Pyridin* gelöst, mit *Dicyclohexylcarbodiimid* versetzt und gut verschlossen 3 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt. Danach wurden 3 ccm Wasser/Pyridin (9:1) zugegeben. Die wäßr. Pyridinphase wurde 3 mal mit je 5 ccm Cyclohexan ausgeschüttelt, die organische Phase abgetrennt und die wäßr. Phase stark eingengt. Nach der Abtrennung von Dicyclohexylharnstoff mittels einer Glasfilterfritte hat man die Lösung über eine Säule (15 × 2 cm) vom *Ionenaustauscher Merck I* (Pyridinium-Form) gegeben, mit 95 ccm Wasser/Pyridin (9:1) gewaschen und die vereinigten Eluate eingedampft. Durch mehrmaliges Abdampfen mit 20-proz. wäßr. Äthanol wurde das Pyridin entfernt, der Rückstand in 5 ccm

Tabelle 3. Bedingungen für die Synthese der Ribonucleotide

DCC = Dicyclohexylcarbodiimid; RNase = Ribonuclease; DMF = Dimethylformamid

Syntheseprodukt	Ansatz	Enzymatische Hydrolyse der Dinucleosid-2'.3'-cyclophosphate	Hydrolyse mit 5 ccm methanol. NH ₃
Adenylyl-(3' → 5')-uridin-3'-phosphat	0.1 mMol 5 oder 8a ; 0.3 mMol 9a ; 500 mg DCC/1.5 ccm Pyridin	1 mg RNase; 5 ccm 0.5 <i>m</i> Tris-Puffer (pH 7.8)	12 Stdn.
Adenylyl-(3' → 5')-cytidin-3'-phosphat	0.1 mMol 8a ; 0.3 mMol 10 ; 500 mg DCC/1.5 ccm Pyridin	1 mg RNase; 5 ccm 0.5 <i>m</i> Tris-Puffer (pH 7.8) + 1 ccm Dioxan	12 Stdn.
Adenylyl-(3' → 5')-guanosin-3'-phosphat	0.1 mMol 8a ; 0.3 mMol 9b ; 500 mg DCC/1.5 ccm Pyridin	1 mg RNase T ₁ ; 5 ccm 0.5 <i>m</i> Tris-Puffer (pH 7.8) + 1 ccm Dioxan	12 Stdn.
Uridylyl-(3' → 5')-uridin-3'-phosphat	0.1 mMol 8b ; 0.3 mMol 9a ; 100 mg DCC/0.5 ccm DMF, + 1 ccm Pyridin	4 mg RNase; 3 ccm 0.1 <i>m</i> Imidazol/HCl-Puffer (pH 7)	30 Min.
Uridylyl-(3' → 5')-cytidin-3'-phosphat	0.1 mMol 8b ; 0.3 mMol 10 ; 400 mg DCC/1 ccm Pyridin	4 mg RNase; 3 ccm 0.1 <i>m</i> Imidazol/HCl-Puffer (pH 7)	3 Stdn.
Uridylyl-(3' → 5')-guanosin-3'-phosphat	0.1 mMol 8b ; 0.3 mMol 9b ; 500 mg DCC/1 ccm Pyridin	0.5 mg RNase T ₁ ; 5 ccm Wasser + 1 ccm 0.1 <i>m</i> Imidazol/HCl- Puffer (pH 7)	30 Min.
Cytidylyl-(3' → 5')-uridin-3'-phosphat	0.1 mMol 8c ; 0.3 mMol 10 ; 500 mg DCC/1.5 ccm Pyridin	4 mg RNase; 3 ccm Wasser + 1 ccm 0.1 <i>m</i> Imidazol/ HCl-Puffer (pH 7)	3 Stdn.
Cytidylyl-(3' → 5')-cytidin-3'-phosphat	0.1 mMol 8c ; 0.3 mMol 9a ; 500 mg DCC/1.5 ccm Pyridin	4 mg RNase; 3 ccm Wasser + 1 ccm 0.1 <i>m</i> Imidazol/ HCl-Puffer (pH 7)	3 Stdn.
Cytidylyl-(3' → 5')-guanosin-3'-phosphat	0.1 mMol 8c ; 0.3 mMol 9b ; 500 mg DCC/1.5 ccm Pyridin	0.5 mg RNase T ₁ ; 3 ccm Wasser + 1 ccm 0.1 <i>m</i> Imidazol/ HCl-Puffer (pH 7)	3 Stdn.

0.3*m* Tris-Puffer (pH 7.0) gelöst (in einigen Fällen war die Zugabe von 1 ccm Dioxan erforderlich) und mit *Ribonuclease* (bzw. Ribonuclease T) versetzt. Nach 3 stdg. Inkubation bei 37° wurde die Lösung über eine Säule (15 × 2 cm) des Ionenaustauschers Merck I (Pyridinium-Form) gegeben und mit 140 ccm 20-proz. wäßr. Äthanol gewaschen. Die vereinigten Eluate wurden eingedampft. Zur Bestimmung der Hydrolysedauer (30 Min. bis 12 Std., je nach Schutzgruppe) wurden 10% des Rückstandes mit 5 ccm methanol. *NH*₃ stehengelassen; dann wurde die Lösung eingedampft, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und papierchromatographiert.

Die Hauptmenge des Ansatzes wurde an einer Säule von *DEAE-Cellulose* mit einem linearen Gradienten von 0–0.25*m* Triäthylammonium-hydrogencarbonat (pH 7.8; Vorratsgefäß mit 2 l 0.5 *m* Triäthylammonium-hydrogencarbonat, Mischgefäß mit 2 l Wasser) aufgetrennt. Die Ausbeute (20–42% d. Th., bez. auf eingesetztes Nucleosidmonophosphat) wurde spektrophotometrisch bestimmt: ϵ (Dinucleotid) = $\Sigma \epsilon$ (Mononucleotide) – 5% Hyperchromie. Alle Dinucleotide wurden durch *Ribonuclease* bzw. Milz-Phosphodiesterase unter Standardbedingungen (vgl. S. 221) partiell oder vollständig hydrolysiert. Die Bedingungen für die Synthese der einzelnen *Ribodinucleotide* enthält Tabelle 3; *R_F*-Werte in Tab. 1 (S. 220).

[174/66]