

**160. Nucleoside und Nucleotide. Teil 11.**  
**Phosphorylierung von 1-(2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon und**  
**dessen Verhalten bei der Synthese von Dinucleotiden<sup>1)2)</sup>**

von Felix Waldmeier und Christoph Tamm

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

(22. III. 78)

**Nucleosides and Nucleotides, Part 11.**  
**Phosphorylation of 1-(2'-Deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon and**  
**its Behaviour in the Synthesis of Dinucleotides**

*Summary*

The behaviour of the unnatural nucleoside 1-(2'-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon ( $\Pi_d$ , **1**) in the synthesis of dinucleotides with purine deoxy-nucleotides was studied. The optimized preparation of the protected dinucleoside phosphates (MeOTr) $\Pi_d$ pG<sub>d</sub><sup>ib</sup> (**5**) and (MeOTr) $\Pi_d$ pA<sub>d</sub><sup>bz</sup> (**7**) using the diester method of *Khorana* with DCC as condensing agent is described. The removal of the *N*-acyl- and *p*-methoxytrityl groups was effected by successive treatment with conc. ammonia solution and acetic acid/water 1:1 at 23° yielding the free dinucleoside phosphates  $\Pi_d$ pG<sub>d</sub> (**9**) and  $\Pi_d$ pA<sub>d</sub> (**11**). In a similar way, starting from (CNEt)p $\Pi_d$  (**15**), the dinucleotides p $\Pi_d$ pG<sub>d</sub><sup>ib</sup> (**16**), p $\Pi_d$ pG<sub>d</sub> (**18**), p $\Pi_d$ pA<sub>d</sub><sup>bz</sup> (**17**) and p $\Pi_d$ pA<sub>d</sub> (**19**) were synthesized.

The nucleotide 1-(5'-*O*-Phosphoryl-2'-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (p $\Pi_d$ , **3**) was prepared in excellent yield by selective phosphorylation of  $\Pi_d$  (**1**) using phosphorylchloride in triethyl phosphate at -40°. Deoxyadenosine was phosphorylated in the same way.

The compounds were characterized by UV. spectroscopy, chromatography and enzymatic degradation.

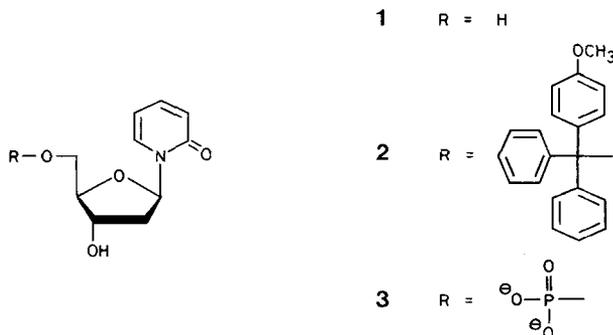
**1. Einleitung.** - Im Hinblick auf die Synthese von Polynucleotiden mit dem unnatürlichen Nucleosid 1-(2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon ( $\Pi_d$ , **1**)<sup>3)</sup> für enzymatische Versuche nach einem von uns entwickelten Konzept [5] war die genaue Abklärung der Reaktivität von  $\Pi_d$  notwendig. In diesem Zusammenhang hatten wir die Verknüpfbarkeit von  $\Pi_d$  mit den Pyrimidinnucleotiden pT<sub>d</sub> und pC<sub>d</sub> unter den üblichen Bedingungen der Oligonucleotidsynthese nach der Diester-

1) Teil 10 s. [1].

2) Für Details s. [2].

3) Zu den Abkürzungen vgl. [3] [4].

Methode weitgehend abgeklärt. So wurden ausgehend von 1-(5'-*O*-Monomethoxytrityl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon ((MeOTr) $\Pi_d$ , **2**) die geschützten Dinucleosidphosphate (MeOTr) $\Pi_d$ pT<sub>d</sub> [6] und (MeOTr) $\Pi_d$ pC<sub>d</sub><sup>an</sup> [7] synthetisiert und durch Abspaltung der Schutzgruppen die freien Dinucleosidphosphate  $\Pi_d$ pT<sub>d</sub> und  $\Pi_d$ pC<sub>d</sub> gewonnen. Im weiteren wurden ausgehend von 1-(5'-*O*-Phosphoryl-3'-*O*-acetyl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon (p $\Pi_d$ (Ac), 3'-*O*-Acetyl-3) die Trinucleosidphosphate (MeOTr)T<sub>d</sub>pT<sub>d</sub>p $\Pi_d$  und T<sub>d</sub>pT<sub>d</sub>p $\Pi_d$  hergestellt [1].



Diese erfolgreich verlaufenen Synthesen haben gezeigt, dass unter den Bedingungen der wichtigsten bisher durchgeführten Reaktionen die labile glykosidische Bindung in  $\Pi_d$  nicht angegriffen wird. Damit liegen die im Hinblick auf eine Polynucleotidsynthese benötigten Erfahrungen mit Pyrimidinnucleotiden vor. Hingegen war noch unbekannt, unter welchen Bedingungen sich  $\Pi_d$  mit Purinnucleotiden verknüpfen lässt. Die beiden natürlichen Purinnucleotide pA<sub>d</sub> und pG<sub>d</sub> besitzen eine Aminogruppe, die bei der Polynucleotidsynthese zu schützen ist. Ausserdem ist bekannt, dass Purinnucleotide speziell gegenüber Säure weniger stabil sind als die Pyrimidinnucleotide [8] [9]. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Verknüpfbarkeit von  $\Pi_d$  mit Purinnucleotiden unter Berücksichtigung des breiten Spektrums der bei einer Kettensynthese vorkommenden Reaktionen (Einführung und Abspaltung von Schutzgruppen, Kondensationen). Wir synthetisierten zu diesem Zweck die Dinucleosidphosphate  $\Pi_d$ pG<sub>d</sub> (**9**) und  $\Pi_d$ pA<sub>d</sub> (**11**) sowie die Dinucleotide p $\Pi_d$ pG<sub>d</sub> (**18**) und p $\Pi_d$ pA<sub>d</sub> (**19**) und jeweils die mit geeigneten Schutzgruppen versehenen Derivate dieser Verbindungen.

Das für die Synthese der Dinucleotide benötigte Nucleotid 1-(5'-*O*-Phosphoryl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon (p $\Pi_d$ , **3**) wurde durch ein rationelleres Verfahren als bisher [1] [3] hergestellt.

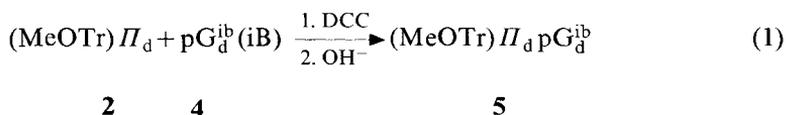
Beide Verbindungstypen, Dinucleosidmonophosphate wie 5'-Dinucleotide, sind Syntheseprodukte bei der Polynucleotidsynthese nach der Diester-Methode von *Khorana* et al. [10-12]. Dabei wird die 5'-Phosphomonoestergruppe eines Nucleotids oder Oligonucleotids mit der 3'-Hydroxygruppe eines anderen Nucleosids bzw. Oligonucleotids (Blocksynthese) kondensiert, wobei als Kondensationsmittel Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS) oder Mesitylsulfonylchlorid (MS) in Frage kommen [10].

In neuerer Zeit hat sich die Polynucleotidsynthese nach der Triester-Methode stark entwickelt, wobei verschiedene Varianten zu beachtlichen Erfolgen führten

[13]. Mit Rücksicht auf  $\Pi_d$  verfahren wir dennoch wie bisher nach der Diester-Methode, die zwar nicht in jeder Hinsicht optimal, jedoch schonend ist und sich auf eine grosse Erfahrung abstützen kann.

**2. Synthese von (MeOTr) $\Pi_d$ pG<sub>d</sub><sup>ib</sup> (5).** – Als Schutzgruppen bei der Kondensation verwendeten wir für die 5'-Hydroxygruppe von  $\Pi_d$  den bewährten Monomethoxytrityl-Rest [10] und für die Amino- und 3'-Hydroxygruppe von pG<sub>d</sub> den ebenfalls bewährten Isobutyryl-Rest [13]. (MeOTr) $\Pi_d$  (2) wurde nach [6] und pG<sub>d</sub><sup>ib</sup> (4) in Anlehnung an die von *Khorana & Büchi* beschriebene Methode hergestellt [14]. Als Kondensationsmittel verwendeten wir DCC, da TPS bei  $\Pi_d$  partielle Basenabspaltung bewirkt [6].

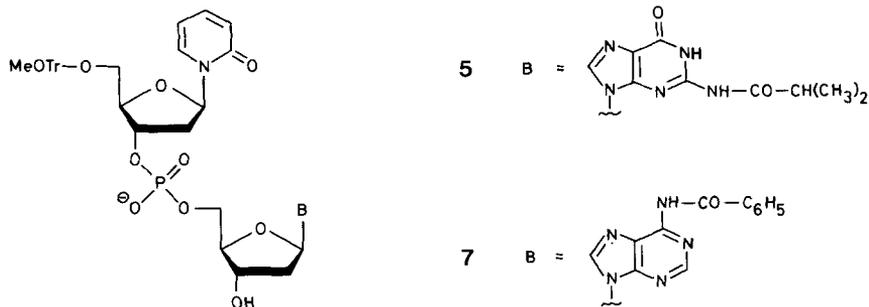
Zur Synthese von (MeOTr) $\Pi_d$ pG<sub>d</sub><sup>ib</sup> (5) wurden das Nucleosid 2 und das Nucleotid 4 (vgl. Gl. (1)) in absolutem Pyridin drei bis sieben Tage bei Raumtemperatur mit einem fünf- bis zehnfachen Überschuss an DCC behandelt.



Da von 2 grössere Mengen zur Verfügung standen als von 4, arbeiteten wir anfänglich mit einem Überschuss von 2. Bessere Resultate wurden jedoch mit überschüssigem 4, entsprechend Literaturangaben [10] erhalten. Beim üblichen Vorgehen zum Trocknen der Reaktanden, nämlich mehrmaligem Eindampfen mit absolutem Pyridin im Hochvakuum [15], wurde eine zunehmende Braunfärbung der Substanzen beobachtet. Wir vermuten deshalb, dass dieses Vorgehen für einige Nucleotide schädlich ist, und trockneten 2 und 4 ohne Pyridin im Hochvakuum. Aus einer neueren Studie über den Wirkungsmechanismus von DCC kann zudem geschlossen werden, dass sich Feuchtigkeit nicht so stark wie bisher angenommen auswirkt [16]. Unter Einhaltung optimaler Bedingungen (s. exper. Teil) wurde weder Farbentwicklung noch Bildung von Nebenprodukten beobachtet.

Zur Hydrolyse des überschüssigen Kondensationsmittels wurde das Reaktionsgemisch zuerst mit Pyridin verdünnt und dann mit Wasser 18 Stunden gerührt. Der Dicyclohexylharnstoff wurde darauf am besten durch Abfiltrieren und Extraktion mit Äther/Pentan 4:1 aus einer 10proz. wässrigen Pyridinlösung entfernt, da sich dabei keine Emulsionen bildeten. Hierauf wurde durch alkalische Hydrolyse unter den üblichen Bedingungen [15] die 3'-Isobutyrylgruppe selektiv entfernt. Zur weiteren Reinigung und Isolierung von 5 erwies sich Extraktion mit 2-Butanol aus wässriger Phase als ungünstig, obwohl dieses Verfahren sich in einem ähnlichen Falle bewährt hatte [6]. Die Resultate waren nicht reproduzierbar, und 5 enthielt verschiedene Verunreinigungen. Besser verlief die Reinigung mittels präparativer Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel mit Methanol/Chloroform 1:1. Dieses Vorgehen war auch bei der Reinigung von (MeOTr) $\Pi_d$ pC<sub>d</sub><sup>an</sup> erfolgreich [7]. Da dieses Verfahren aber mit Substanzverlusten verbunden war, versuchten wir die Reinigung von 5 auch mittels Chromatographie an DEAE-Sephadex-Ionenaustauscher. Beim Arbeiten mit einem Gradienten von wässrigem Ammoniumhydrogencarbonat verzögerte sich die Eluierung von 5 jedoch wegen der Affinität der lipophilen Schutzgruppen zum *Sephadex*-Trägermaterial, so dass keine Trennung von Nucleotid pG<sub>d</sub><sup>ib</sup> zustande kam. Sehr gut verlief die Trennung jedoch, wenn mit einem Gradienten von Ammoniumhydrogencarbonat in 50proz. wässrigem Äthanol eluiert wurde. Diese Arbeitsweise hatte sich schon in anderen ähnlichen Fällen als erfolgreich erwiesen [7] [17] [18]. Das dabei erhaltene dünn-

chromatographisch reine Produkt **5** wurde zuerst, wie in der Literatur beschrieben, durch Fällen aus Äther [15], später aber schonender durch Lyophilisieren aus einer wässrigen Lösung isoliert, die Pyridin und Äthanol enthielt.

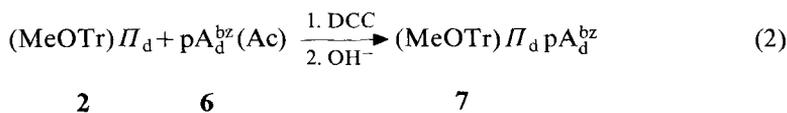


Die zuerst erreichten Ausbeuten an **5** von 36–45% beim Arbeiten nach Literaturangaben liessen sich durch Einhalten der beschriebenen optimalen Bedingungen auf 83% steigern.

Das UV.-Spektrum von **5** zeigte Absorptionsmaxima bei 282 nm (auf der längerwelligen Seite flach abfallend), 258–262 und 228 nm, was einer Überlagerung der Spektren der Edukte **2** und **4** entspricht. Die weitere Charakterisierung erfolgte durch Entfernung der Schutzgruppen und enzymatische Spaltung (siehe unten).

**3. Synthese von (MeOTr) $\Pi_d$ pA $_d^{bz}$  (**7**). – Zur Synthese von (MeOTr) $\Pi_d$ pA $_d^{bz}$  (**7**) verwenden wir für Desoxyadenosin die bewährten Schutzgruppen Benzoyl an der Aminogruppe und Acetyl an der 3'-Hydroxygruppe [10]. Das zur Synthese benötigte pA $_d^{bz}$ (Ac) (**6**) wurde in Anlehnung an das von *Ralph & Khorana* beschriebene Verfahren hergestellt [19].**

(MeOTr) $\Pi_d$  (**2**) und pA $_d^{bz}$ (Ac) (**6**) wurden im Verhältnis 1,2:1 als trockene Pulver mit DCC in Pyridin umgesetzt (vgl. Gl. (2) und Kap. 2).



Nach sieben Tagen zeigte das braune Gemisch im Dünnschichtchromatogramm nur geringe Nebenproduktbildung.

Die Aufarbeitung und die alkalische Hydrolyse der 3'-O-Acetylgruppe wurde wie in Kap. 2 beschrieben vorgenommen. Das röhre **7** wurde darauf an *DEAE-Sephadex* mit einem zweistufigen Gradienten von wässrigem Ammoniumhydrogencarbonat chromatographiert [18]. Im ersten Gradienten mit 15% Methanol wurde das symmetrische Pyrophosphat A $_d^{bz}$ -5'-pp-5'-A $_d^{bz}$  eluiert, im zweiten mit 50% Äthanol das gewünschte Produkt **7** und das Mononucleotid pA $_d^{bz}$ . Durch Fällen aus Äther erhielten wir das reine (MeOTr) $\Pi_d$ pA $_d^{bz}$ .

Das UV.-Spektrum von **7**, das in einer Ausbeute von 68% erhalten wurde, zeigte ein Maximum bei 281 nm (auf der längerwelligen Seite flach abfallend) und eine

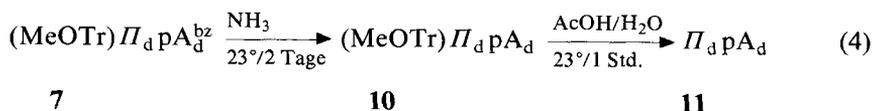
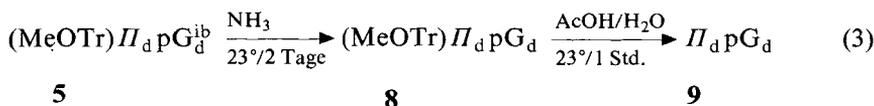
Schulter bei 229 nm, was einer Überlagerung der Spektren von **2** und **6** entspricht. Die weitere Charakterisierung erfolgte wiederum durch Entfernung der Schutzgruppen und enzymatische Spaltung (siehe unten).

**4. Entfernung der Schutzgruppen bei Dinucleosidphosphaten.** - Zur vollständigen und schonenden Entfernung der Monomethoxytrityl-Gruppe aus **5** und **7** wurden verschiedene Enttritylierungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit geprüft.

Gregor *et al.* hatten festgestellt, dass die Methode mit 80proz. wässriger Essigsäure bei 100°, die zur Enttritylierung von Thymidinderivaten verwendet worden war [9], aber bei Desoxypurinnucleotiden Basenabspaltung bewirkt, auch bei  $\Pi_d$  quantitativ zum Bruch der glykosidischen Bindung führt [6]. Ebenso hatten andere Beobachtungen, wie die basenabspaltende Wirkung von TPS [6] oder von Chlorphosphorsäure-bis(2,2,2-trichloräthylester) [3] auf die Säurelabilität von  $\Pi_d$  hingewiesen. Aus diesem Grunde wurde zur Enttritylierung von Verbindungen, die  $\Pi_d$ ,  $T_d$  und  $C_d$  enthielten, die mildere Methode mit Essigsäure/Pyridin 7:3 bei 100° angewandt [1] [6]. Wir versuchten darum auch (MeOTr) $\Pi_d$ pG $_d^{ib}$  (**5**), nach Behandlung mit Ammoniak, auf diese Weise zu enttritylieren. Dabei wurden aber aus dem gewünschten Produkt  $\Pi_d$ pG $_d$  (**9**) ca. 50% Guanin abgespalten. Weitere Versuche mit anderen Enttritylierungsreagentien bei 100° zeigten, dass sich zwar Bedingungen finden lassen, unter denen  $\Pi_d$  stabil ist, dass aber dabei bei  $G_d$  immer beträchtliche Basenabspaltung eintritt. Dies war der Fall bei Behandlung mit Essigsäure/Methanol 1:9 während 30 Minuten, mit Essigsäure/Äthanol/Wasser 1:4:15 während 40 Minuten und mit 1proz. Salzsäure in Methanol während 3 Minuten bei 100°. Dagegen liessen sich bei Raumtemperatur  $\Pi_d$ - wie  $G_d$ -Derivate in wässriger Essigsäure [20] bei nicht zu langer Reaktionsdauer schonend enttritylieren. So war Basenabspaltung mit 80proz. Essigsäure erst nach ca. 4 Stunden, mit 50proz. erst nach ca. 15 Stunden bei  $G_d$  feststellbar.  $\Pi_d$  ist in wässriger Essigsäure bei Raumtemperatur stabil. Die Enttritylierung benötigte jeweils ca. 20 bzw. 60 Minuten.

Die Versuche erlauben eine Aussage über die Stabilität der glykosidischen Bindung von  $\Pi_d$  gegenüber Säure. Sowohl bei 100° wie bei 23° erwies sich  $\Pi_d$  als etwas stabiler als  $G_d$ , woraus sich die Stabilitätsreihe: Desoxypyrimidinnucleoside >  $\Pi_d$  > Desoxypurinnucleoside ergibt.

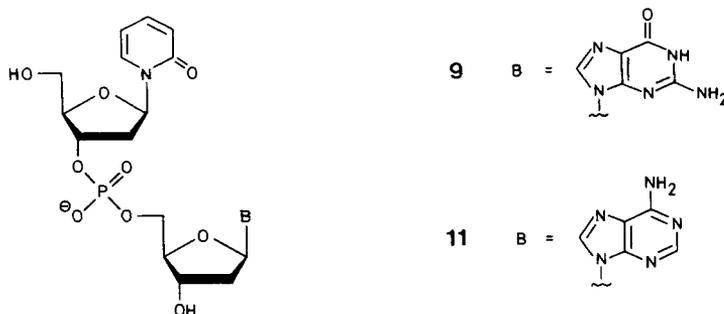
Die Entfernung der Schutzgruppen bei den Verbindungen **5** und **7** wurde schliesslich wie folgt durchgeführt (vgl. Gl. (3) und (4)): Mit konz. Ammoniak wurde die *N*-Isobutyryl- bzw. die *N*-Benzoylgruppe, dann mit wässriger Essigsäure bei 23° die Monomethoxytritylgruppe abgespalten. Die Reaktionen liessen sich im Dünnschichtchromatogramm verfolgen, wobei die auftretenden Zwischenprodukte **8** und **10** nicht isoliert wurden. Die Enttritylierung erfolgte nach der Ammonolyse, da die glykosidische Bindung in *N*-acylierten Nucleotiden unter sauren Bedingungen labiler ist als in den ungeschützten. Dies gilt besonders für die Desoxypurinnucleotide [9] [21].



Pyridin musste nach der Ammonolyse sorgfältig entfernt werden, da es die Enttritylierung verzögern kann. Die Enttritylierung wurde durch Eindampfen im Hochvakuum beendet. Die so erhaltenen

Dinucleosidphosphate **9** und **11** wurden an *DEAE-Sephadex* mit einem Gradienten von wässrigem Ammoniumhydrogencarbonat chromatographiert und lyophilisiert.

Die reinen Verbindungen **9** und **11** wurden in Ausbeuten von 95 bzw. 85% (ohne Berücksichtigung der Hypochromie) erhalten. In ihren UV.-Spektren waren die Maxima von  $\Pi_d$  und  $G_d$  bzw.  $A_d$  leicht zu erkennen: **9** zeigte Maxima bei 231 und 254 nm und Schultern bei 270–275 und 301 nm, **11** Maxima bei 262 und 301,5 nm und eine Schulter bei 227 nm. Die Spektren von **9** und **11** waren ausserdem identisch mit denen von  $p\Pi_d pG_d$  (**18**) bzw.  $p\Pi_d pA_d$  (**19**). Die weitere Charakterisierung erfolgte durch enzymatische Spaltung (siehe unten).



**5. Phosphorylierung von  $\Pi_d$  (**1**) zu  $p\Pi_d$  (**3**).** - Für die Synthese von Dinucleotiden wie  $p\Pi_d pG_d$  (**18**) und  $p\Pi_d pA_d$  (**19**) (vgl. Kap. 7) wurde  $p\Pi_d$  (**3**), das 5'-Phosphat von  $\Pi_d$  benötigt.  $p\Pi_d$  war bisher auf zwei nicht ganz befriedigenden Wegen hergestellt worden.

$\Pi_d$  wurde früher von uns mit Chlorphosphorsäure-bis(2,2,2-trichloräthylester) nach *Eckstein et al.* [22] selektiv in 5'-Stellung phosphoryliert [3]. Nach reduktiver Entfernung der Schutzgruppen wurde  $p\Pi_d$  in einer Ausbeute von 18%, nach Verbesserung des Verfahrens von 33% erhalten. Das Verfahren von *Eckstein* war das erste gewesen, das die selektive 5'-Phosphorylierung ungeschützter Nucleoside erlaubte. Im Falle von  $\Pi_d$  erwiesen sich jedoch die Bedingungen als zu wenig mild.

Wir stellten deshalb  $p\Pi_d$  auch auf dem klassischen, aufwendigen Wege nach *Tener* [23] her. Dabei wurde das 3'-O-Acetylderivat von  $\Pi_d$  durch aufeinanderfolgende 5'-Tritylierung, 3'-Acetylierung und 5'-Entritylierung des Nucleosids hergestellt und mit Phosphorsäure-2-cyanoäthylester in Anwesenheit von DCC in nur 22% Gesamtausbeute zu  $p\Pi_d$  umgesetzt [1].

Da  $p\Pi_d$  eine Schlüsselverbindung darstellt, war es deshalb notwendig, eine leistungsfähigere Synthese zu suchen.

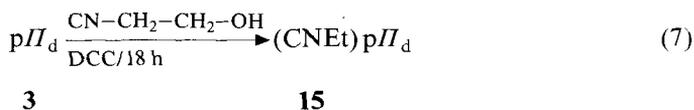
In den letzten Jahren ist das Interesse an modifizierten Nucleotiden und an Phosphorylierungsmethoden gestiegen, da nicht nur Nucleosidanaloga, sondern - wie sich neuerdings zeigte - auch Nucleotidanaloga interessante biologische Eigenschaften besitzen [24]. In diesem Zusammenhang wurde eine grosse Zahl von Nucleosiden phosphoryliert und eine Vielfalt von Methoden geprüft [11] [25]. Bisher am erfolgreichsten war das Verfahren von *Yoshikawa* [26], das die selektive 5'-Phosphorylierung ungeschützter Nucleoside mit Phosphorylchlorid in Phosphorsäuretriäthylester bei 0° erlaubt. Die Reaktion ist schonend und läuft in einem einzigen Schritt ab. Die damit erzielten Ausbeuten waren bei Ribonucleosiden sehr hoch, bei Desoxyribonucleosiden und Purinnucleosiden jedoch unter dem Durchschnitt. Auch Nucleosidanaloga liessen sich auf diese Weise phosphorylieren [25] [27]. Nicht phosphorylierbar waren aber Desoxyadenosin und Desoxyguanosin [26].





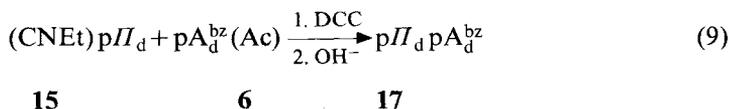
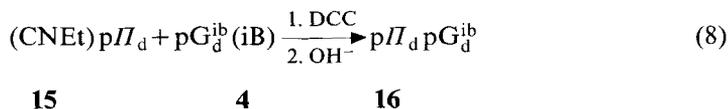
Die beschriebene Methode dürfte sich auch zur Phosphorylierung anderer labiler Nucleoside eignen.

**7. Synthese von pII<sub>d</sub>pG<sub>d</sub><sup>ib</sup> (16) und pII<sub>d</sub>pA<sub>d</sub><sup>bz</sup> (17).** - Zur Synthese der Dinucleotide **16** und **17** wurde das Nucleotid pII<sub>d</sub> (**3**) an der Phosphatgruppe durch den β-Cyanoäthylrest geschützt, der zwar in verschiedener Hinsicht nicht optimal ist, mit dem jedoch grosse Erfahrung gesammelt worden ist [10-12] [15]. Zudem ist seine Abspaltung unproblematisch. Er wurde bei pII<sub>d</sub> (**3**), wie von *Weber & Khorana* [15] beschrieben, eingeführt (vgl. Gl. (7) und exper. Teil). Das als hygroskopischer Schaum isolierte, dünnschichtchromatographisch reine **15** wurde in 86-88% Ausbeute erhalten.



Das UV.-Spektrum von **15** war identisch mit dem von pII<sub>d</sub> (**3**). Die Anwesenheit der β-Cyanoäthylgruppe war aus den chromatographischen Daten wie aus dem 90-MHz-<sup>1</sup>H-NMR.-Spektrum in DMSO ersichtlich. Die α-Methylenprotonen erschienen als doppeltes Triplet bei 3,74 ppm, die β-Methylenprotonen als Triplet bei 2,71 ppm. Behandlung von **15** mit 1N NaOH bei 0° während 20 Minuten ergab pII<sub>d</sub>.

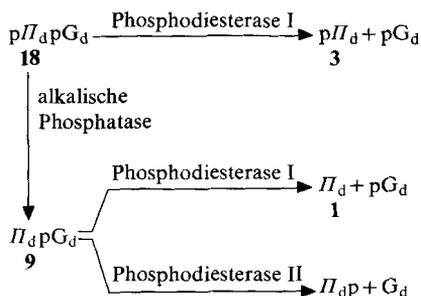
Die Kondensation von (CNEt)pII<sub>d</sub> mit pG<sub>d</sub><sup>ib</sup> (iB) bzw. pA<sub>d</sub><sup>bz</sup> (Ac) wurde, wie in den Kap. 2 und 3 beschrieben, durchgeführt (Gl. (8) und (9) und exper. Teil). Nach Hydrolyse in Wasser/Pyridin und Aufarbeitung wurde durch alkalische Hydrolyse die 3'-O-Isobutyrylgruppe bzw. die 3'-O-Acetylgruppe entfernt. Die Produkte **16** und **17** liessen sich durch Chromatographie an DEAE-Sephadex von mehreren Nebenprodukten rein abtrennen und durch Lyophilisieren aus Wasser als farblose Flocken in 54 bzw. 34% Ausbeute isolieren. Zwar konnten die nicht umgesetzten Edukte teilweise zurückgewonnen werden, ein grosser Teil war aber während der Reaktion zerstört worden oder bei der Aufarbeitung verloren gegangen.



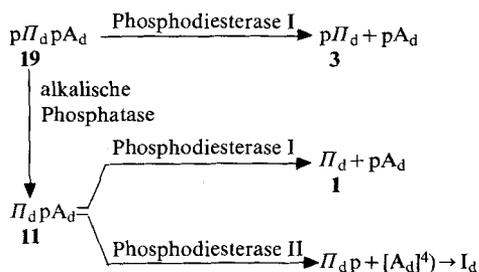


Die Verbindungen wurden UV.-spektroskopisch, chromatographisch (s. Tab. 2, exper. Teil) und enzymatisch charakterisiert. Die enzymatischen Versuche wurden nach Literaturangaben durchgeführt [1] [29]. So wurden die Dinucleotide **18** und **19** mit alkalischer Phosphatase in die Dinucleosidphosphate **9** bzw. **11** übergeführt und durch Phosphodiesterase I zu Mononucleotiden gespalten. Die Dinucleosidphosphate wurden sowohl durch Phosphodiesterase I wie Phosphodiesterase II gespalten (*Schema 1* und 2). Die Spaltprodukte wurden jeweils im erwarteten Verhältnis von 1:1 gefunden (vgl. *Tab. 1*, exper. Teil).

*Schema 1*



*Schema 2*



Die Ergebnisse der beschriebenen Arbeiten zeigen, dass  $\Pi_{\text{d}}$  nach der Diester-Methode leicht mit Purinnucleotiden verknüpft werden kann und dass alle Reaktionen der Oligonucleotidsynthese mit  $\Pi_{\text{d}}$  durchführbar sind. Damit sollte es möglich sein, eine Oligonucleotidkette, die  $\Pi_{\text{d}}$  enthält, ohne Schwierigkeiten zu synthetisieren.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekte Nr. 2.0550.73, 2.294.74 und 2.435.0.75) für die gewährte Unterstützung.

<sup>4)</sup>  $\text{A}_{\text{d}}$  wurde zu Desoxyinosin abgebaut [30].

## Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* S. [1]. Zusätzlich dazu oder abweichend davon: Die UV.-Spektren wurden mit einem Beckman-UV.-Spektrometer, Modell 25, aufgenommen; Angabe von  $\lambda_{\max}$  in nm ( $\epsilon$ ). - Fließmittelsysteme für die DC. (v/v): A) 2-Propanol/konz. Ammoniak-Lösung/Wasser 7:1:2; B) Äthanol/1M Ammoniumacetat pH 7,5, 7:3; C) 1-Butanol/Essigsäure/Wasser 5:2:3; D) Chloroform/Methanol 1:1; E) 1-Propanol/konz. Ammoniak-Lösung/Wasser 6:1:3. - Für die Ionenaustauscherchromatographie wurden die Säulen in der Hydrogencarbonatform vorbereitet. Die Fraktionengröße betrug 23-26 ml bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1,53-1,67 ml/Min. - Zusatz von 1-Butanol zu wässrigen Lösungen verhinderte Schaumbildung und Spritzen beim Eindampfen i.RV. - Bei den Phosphorylierungen wurde Phosphorsäure-triäthylester *pract. Fluka*, Buchs, über Molekularsieb 4 Å getrocknet, verwendet. Phosphorylchlorid (*suprapur.*) wurde bei *E. Merck AG.*, Darmstadt, bezogen. - Fr. = Fraktion.

1-(2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon ( $\Pi_d$ , 1) wurde nach [3] hergestellt. Kristallisation aus Methylchlorid/Petroläther ergab farblose glänzende Plättchen vom Smp. 118-120° ([3]: 116-117,5°).

1-(5'-O-Monomethoxytrityl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon ((MeOTr)  $\Pi_d$ , 2) wurde wie früher beschrieben hergestellt [6]. - UV. (Äthanol): 302 (6650), 229 (20500), 284 Sch. (5020), 275 Sch. (3980);  $\epsilon_{280} = 4920$  (vgl. [6]).

N<sup>2</sup>-Isobutyryl-3'-O-isobutyryl-2'-desoxyguanosin-5'-phosphat (pG<sub>d</sub><sup>ib</sup>(iB), 4) wurde nach [14] [18] hergestellt. Lyophilisiertes pG<sub>d</sub>-Pyridiniumsalz wurde mit 60 Äquiv. Isobuttersäureanhydrid und Pyridin 8 Tage umgesetzt. Nach Methanolyse der klaren Lösung (24 Std.) und Hydrolyse (1 Std.) wurde i.HV. eingedampft und aus Äther gefällt. - UV. (Äthanol): 257 (17765), 280 (11590);  $\epsilon_{280}/\epsilon_{260} = 0,68$  (vgl. [14] [31]).

N<sup>6</sup>-Benzoyl-3'-O-acetyl-2'-desoxyadenosin-5'-phosphat wurde nach [19] hergestellt. - UV. (Äthanol): 281 (20725), 244 min. (10350);  $\epsilon_{280} = 20620$  (vgl. [19]).

2. 1-(5'-O-Monomethoxytrityl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-N<sup>2</sup>-isobutyryl-2'-desoxyguanosin ((MeOTr)  $\Pi_d$  pG<sub>d</sub><sup>ib</sup>, 5). Eine Lösung von 45,5 mg (0,094 mmol; 463 OD<sub>280</sub>-Einheiten<sup>5)</sup>) (MeOTr)  $\Pi_d$  (2), 80 mg (0,141 mmol; 1637 OD<sub>280</sub>) pG<sub>d</sub><sup>ib</sup>(iB) (4) und 194 mg (0,94 mmol, 6,7 Äquiv. bzgl. 4) DCC in 2 ml frisch destilliertem abs. Pyridin<sup>6)</sup> wurde bei 23° im Dunkeln gerührt. Aus der klaren hellgelben Lösung begann sich nach 10 Min. Dicyclohexylharnstoff abzuscheiden. Die Farbe der Lösung blieb während der ganzen Reaktion unverändert<sup>6)</sup>. Nach 7 Tagen wurde mit 8 ml Pyridin verdünnt, mit 8 ml Wasser hydrolysiert und die Suspension weitere 18 Std. gerührt. Dann wurde über Watte vom mikrokristallinen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und der Niederschlag mit 15 ml 50proz. Pyridin gewaschen. Nach Eindampfen des Filtrats fiel wieder Harnstoff aus. Das Gemisch wurde in Pyridin gelöst, mit Wasser auf 150 ml einer 10proz. Pyridinlösung verdünnt, 2mal mit 150 ml Äther/Pentan 4:1 extrahiert und die organischen Phasen je 3mal mit 150 ml 10proz. wässrigem Pyridin zurückgewaschen. Die Trennung der klaren Phasen erfolgte jeweils sofort. Das DC. zeigte vollständige Abtrennung von nicht umgesetztem (MeOTr)  $\Pi_d$  und restlichem Dicyclohexylharnstoff. Nach Eindampfen der wässrigen Phase wurde der Rückstand in 30 ml 50proz. Pyridin gelöst, auf 0° gekühlt und mit 30 ml auf 0° gekühlter 2N NaOH versetzt. Zur Herstellung einer homogenen Lösung wurden 5 ml Äthanol zugegeben. Nach 20 Min. Hydrolyse bei 0° wurde mit 100 ml kaltem Pyridinium-Dowex-50 neutralisiert, nach 15 Min. über eine Säule von Dowex abfiltriert und die Säule zuerst mit 100 ml 25proz. Pyridin, dann mit 100 ml 25proz. Äthanol gewaschen (Durchflussgeschwindigkeit 1,5 ml/Min.). Kontrolle im UV. zeigte, dass alles Material eluiert worden war. Das DC. (Systeme A, B) zeigte neben 5 nur das nicht umgesetzte Mononucleotid pG<sub>d</sub><sup>ib</sup>. Das Eluat wurde eingedampft und als Lösung in 20 ml 50proz. Äthanol auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100 × 1 cm) gebracht. Es wurde mit einem Gradienten von 6 l 0-0,1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in 50proz. Äthanol eluiert. Die Fr. 44-56 (0,018-0,023M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) enthielten 1290 OD<sub>280</sub>-Einheiten (83%) von 5 und die Fr. 136-160 (0,057-0,067M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 495 OD<sub>280</sub> von pG<sub>d</sub><sup>ib</sup> (30% des eingesetzten 4). Nach Eindampfen i.V. wurde 5 aus 30 ml Wasser/Pyridin/Äthanol 7:2:1 lyophilisiert und als farblose, DC.-einheitliche (A, B) Flocken isoliert (81 mg). - UV. (Äthanol): 282, 258-262, 229;  $\epsilon_{282}/\epsilon_{229} = 0,72$ ,  $\epsilon_{282}/\epsilon_{262} = 0,93$ ,  $\epsilon_{300}/\epsilon_{262} = 0,66$ .

<sup>5)</sup> 1 OD-Einheit ist die Menge Substanz, die in 1-ml-Lösung in einer 1-cm-Zelle eine Absorption von 1,0 ergibt.

<sup>6)</sup> Beim Verwenden von nicht frisch destilliertem Pyridin färbte sich das Gemisch dunkel.

3. 1-(5'-O-Monomethoxytrityl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-desoxyadenosin ((MeOTr) $\Pi_d$ pA $\beta^z$  (7), 322 mg (327 OD<sub>280</sub>; 0,066 mmol) (MeOTr) $\Pi_d$  (2), 30,9 mg (1143 OD<sub>280</sub>; 0,056 mmol) pA $\beta^z$ (Ac) (6) und 95 mg (8,2 Äquiv.) DCC wurden in 1,6 ml destilliertem abs. Pyridin gerührt. Die braune Suspension wurde nach 8 Tagen hydrolysiert, wobei das DC. neben 2 und einer Spur 6 vor allem das gewünschte 7 zeigte. Die Aufarbeitung wurde im wesentlichen wie in Kap. 2 beschrieben vorgenommen. Das so erhaltene rohe 7 wurde als Lösung in 50proz. Äthanol auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100×1 cm) gebracht, die in 2 Stufen eluiert wurde: 1) Gradient von 3 l 0-0,1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in 15proz. Methanol; 2) Gradient von 3 l 0-0,1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in 50proz. Äthanol. Die Fr. 33-40 (0,028-0,033M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 1. Gradient) enthielten 140 OD<sub>280</sub> (10%) A $\beta^z$ -5'-pp-5'-A $\beta^z$ , die Fr. 79-120 (0,003-0,037M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 2. Gradient) 970 OD<sub>280</sub> (68,5%) von 7 und die Fr. 155-166 (0,067-0,076M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 87 OD<sub>280</sub> (6%) pA $\beta^z$ . Nach Eindampfen wurde 7 mit abs. Pyridin aufgenommen und aus 100 ml abs. Äther/Cyclohexan 2:1 gefällt. Nach Zentrifugieren, Waschen mit abs. Äther, Zentrifugieren und Abdekantieren wurde im Stickstoffstrom und darauf i. HV. getrocknet: 39 mg 7 als farbloses Pulver, das DC.-einheitlich war (A, B, C). - UV. (Äthanol): 281, 256 min., 226 Sch.;  $\epsilon_{256}/\epsilon_{281} = 0,57$ ,  $\epsilon_{300}/\epsilon_{281} = 0,57$ .

4. 1-(3'-O-Phosphoryl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-2'-desoxyguanosin ( $\Pi_d$ pG<sub>d</sub>, 9), 92,7 mg (1475 OD<sub>280</sub>) (MeOTr) $\Pi_d$ pG $\beta^z$  (5) wurden in 6 ml Pyridin gelöst, mit 12 ml konz. Ammoniak versetzt und 60 Std. im Dunkeln bei 23° stehengelassen, zur Trockne eingedampft und durch wiederholtes Eindampfen i. HV. mit wässrigem Äthanol von Pyridin befreit. Das DC. zeigte ein Monomethoxytrityl-haltiges Produkt ((MeOTr) $\Pi_d$ pG<sub>d</sub>, 8), das einen kleineren Rf-Wert als 5 hatte (A, B). Dann wurde mit wenig Essigsäure gelöst, mit 30 ml 50proz. wässriger Essigsäure verdünnt und 1 Std. stehengelassen. Nach Eindampfen der Lösung am Lyophilisierapparat bei 0,05 Torr wurde bis zum Verschwinden des Essigsäureruchs noch 3mal mit wässrigem Äthanol eingedampft. Das DC. zeigte die Substanz 9 und Monomethoxytritylalkohol. Der Rückstand wurde in wenig wässrigem Äthanol gelöst, mit Wasser auf 20 ml verdünnt und 3mal mit je 100 ml Äther extrahiert. Nach 2maligem Waschen der organischen Phasen mit je 10 ml Wasser wurden die wässrigen Phasen vereinigt, eingengt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100×1 cm) gebracht. Die Säule wurde mit einem Gradienten von 4 l 0-0,03M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> eluiert. In den Fr. 92-100 (0,016-0,017M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) waren 10 OD<sub>280</sub> (1%) einer Substanz (=  $\Pi_d$ pG $\beta^z$ , nicht isoliert) enthalten, deren UV.-Spektrum mit dem von p $\Pi_d$ pG $\beta^z$  (16) identisch war. Die Fr. 107-140 (0,0185-0,024M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), die 903 OD<sub>280</sub> (95%) von  $\Pi_d$ pG<sub>d</sub> (9) enthielten, wurden vereinigt und eingedampft. Lyophilisieren aus Wasser ergab 51,2 mg farblose Flocken des DC.-einheitlichen (A, B) 9. - UV. (Wasser): 254 (12125), 231 (7760), 270-275 Sch. (9820), 301 Sch. (4715);  $\epsilon_{280} = 9540$ .

5. 1-(3'-O-Phosphoryl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-2'-desoxyadenosin ( $\Pi_d$ pA<sub>d</sub>, 11), 138 mg (3440 OD<sub>280</sub>) (MeOTr) $\Pi_d$ pA $\beta^z$  (7) wurden in 4 ml Pyridin und 12 ml konz. Ammoniak gelöst und 48 Std. bei 23° im Dunkeln stehengelassen. Das DC. zeigte vollständige Abspaltung der Benzoylgruppe. Das nicht isolierte (MeOTr) $\Pi_d$ pA<sub>d</sub> (10) wurde bei 30°, wie in Kap. 4 beschrieben, mit Essigsäure zu  $\Pi_d$ pA<sub>d</sub> (11) umgesetzt. Das rohe 11, das mit 2 Nebenprodukten verunreinigt war, wurde im wesentlichen wie in Kap. 4 beschrieben aufgearbeitet und chromatographiert. In den Fr. 17-20 (0,003-0,004M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) wurden 160 OD<sub>260</sub> (8%) Adenin eluiert, in den Fr. 58-70 (0,01-0,012M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 60 OD<sub>300</sub> (8%) eines 2-Pyridon enthaltenden Abbauprodukts von  $\Pi_d$ pA<sub>d</sub>, und in den Fr. 78-104 (0,013-0,018M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) waren 1805 OD<sub>262</sub> (85%) 11 enthalten. Eindampfen und Lyophilisieren ergaben 76,5 mg DC.-einheitliches (A, B, C) 11 in Form eines harten, gelblichen, hygrokopischen Schaums. - UV. (Wasser): 301,5, 262, 227 Sch.;  $\epsilon_{301,5}/\epsilon_{262} = 0,38$ ,  $\epsilon_{227}/\epsilon_{262} = 0,53$ .

6. 1-(5'-O-Phosphoryl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon (p $\Pi_d$ , 3). In einem Reagensglas mit Sovirelverschluss wurden bei 0° zu 1 ml abs. Phosphorsäuretriäthylester 130  $\mu$ l (1,42 mmol) POCl<sub>3</sub> und 12,8  $\mu$ l (0,71 mmol) Wasser gegeben. Nach 5 Min. Stehen bei 0° wurden 50 mg (0,24 mmol, 1430 OD<sub>303</sub>)  $\Pi_d$  (1) zugegeben. Nach kurzem Schwenken der Suspension wurde das gut verschlossene Gefäß in ein Kältebad von -40° gestellt. Nach 2 Tagen war alles  $\Pi_d$  in Lösung gegangen. Nach 20 Tagen bei -40° wurde mit 10 ml Wasser bei 0° 30 Min. hydrolysiert, mit konz. Ammoniak neutralisiert und durch Abdampfen des überschüssigen Ammoniaks die Lösung auf pH 6 gebracht. Die Lösung wurde auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100×1 cm) gebracht und die Säule mit einem Gradienten von 6 l 0-0,1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> eluiert. Die Fr. wurden neben der UV.-Kontrolle mit Silbernitrat auf Chlorid-Ionen und mit Ammoniummolybdat-Reagens auf Phosphat-Ionen untersucht. Mit den Fr. 4-7 wurden 139 OD<sub>302</sub> (10%)  $\Pi_d$  eluiert. In den Fr. 75-90 (0,029-0,035M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) wurde Phosphat, in den Fr. 90-

105 (0,035-0,040M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) Chlorid gefunden. Die Fr. 164-195 (0,063-0,075M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) enthielten 1270 OD<sub>302</sub> (89%)  $pI_d$  (3). Eindampfen und Lyophilisieren ergaben 74 mg DC.-reines (A, B, C, E) 3 als farblosen, harten, schwach hygroskopischen Schaum. - UV. (Wasser): 302, 225 nm;  $\epsilon_{225}/\epsilon_{302} = 0,85$ .

7. 2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat ( $pA_d$ , 14). 31,4 mg (0,125 mmol)  $A_d$  (13) wurden in 0,5 ml abs. Phosphorsäure-triäthylester suspendiert und bei 0° mit 6,8  $\mu\text{l}$  (0,38 mmol) Wasser und 69  $\mu\text{l}$  (0,75 mmol)  $\text{POCl}_3$  wie in Kap. 6 versetzt. Nach 20 Tagen bei -40° wurde hydrolysiert, mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und wie in Kap. 6 chromatographiert. In den Fr. 2-4 wurden 165 OD<sub>259</sub> (9%)  $A_d$ , in den Fr. 5-9 700 OD<sub>259</sub> (38%) Adenin eluiert. Chlorid wurde in den Fr. 45-68 (0,018-0,027M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), Phosphat in den Fr. 78-96 (0,031-0,038M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) gefunden. Vom gewünschten  $pA_d$  (14) waren in den Fr. 156-188 (0,062-0,075M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 790 OD<sub>259</sub> (43%) enthalten. Eindampfen und Lyophilisieren ergab 19,3 mg  $pA_d$  als harten, gelblichen, schwach hygroskopischen, DC.-einheitlichen (A, B, C) Schaum.

8. 1-(5'-O-( $\beta$ -Cyanäthylphosphoryl)-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon ((CNET) $pI_d$ , 15). Eine Lösung von 6760 OD<sub>302</sub>-Einheiten  $pI_d$  (3; 398 mg) in 20 ml Wasser wurde mit 15 ml Pyridinium-Dowex-50 15 Min. stengelassen. Dowex wurde über eine Säule abfiltriert, die Säule mit 100 ml Wasser gewaschen und die Lösung eingedampft. Der Rückstand wurde zur Trocknung mit abs. Pyridin und 3-Hydroxypropionitril i.HV. eingedampft. Anschliessend wurde in 6 ml Pyridin und 3 ml (50 Äquiv.) 3-Hydroxypropionitril gelöst und 2,6 g (10 Äquiv.) DCC zugegeben. Die gelbliche Lösung wurde 18 Std. bei 23° im Dunkeln gerührt und dann mit 30 ml Wasser hydrolysiert. Es wurde 3 Tage gerührt, dann über Watte von Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und der Niederschlag mit 10 ml 50proz. Pyridin gewaschen. Nach Entfernen von Pyridin durch Einengen wurde mit Wasser auf 120 ml verdünnt und mit 80 ml, danach 2mal mit 50 ml Äther ausgeschüttelt und die organischen Phasen je 2mal mit 50 ml Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden eingedampft, der Rückstand in abs. Pyridin gelöst und 3mal aus je 80 ml Äther/Hexan 1:1 gefällt. Der resultierende Lack wurde in Wasser aufgenommen und die Lösung, die 6100 OD<sub>300</sub> (90%) rohes 15 enthielt, auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100  $\times$  1 cm) gebracht. Die Säule wurde in 2 Stufen eluiert: 1) Gradient von 2,4 l 0-0,018M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 2) Gradient von 2,6 l 0,018-0,2M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Die Fr. 72-98 (0,013-0,0175M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) enthielten 5800 OD<sub>301</sub> (86%) (CNET) $pI_d$  (15), in den Fr. 169-188 (0,134-0,166M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) wurden noch 155 OD<sub>301</sub> (2%)  $pI_d$  (3) gefunden. Eindampfen und Lyophilisieren ergaben 369 mg 15 als harten, gelblichen, hygroskopischen, DC.-einheitlichen (A, B, C, E) Schaum. - UV. (Wasser): 301, 226;  $\epsilon_{226}/\epsilon_{301} = 0,86$ ,  $\epsilon_{280}/\epsilon_{301} = 0,55$ .

9. 1-(5'-O-Phosphoryl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-N<sup>2</sup>-isobutyl-2'-desoxyguanosin ( $pI_d$ pG $\ddot{P}$ , 16). Eine Lösung von 813 OD<sub>280</sub>-Einheiten (CNET) $pI_d$  (15) in 20 ml Wasser wurde mit 15 ml Pyridinium-Dowex-50 10 Min. stengelassen. Danach wurde über eine Säule von Dowex abfiltriert, die Säule mit 100 ml Wasser langsam gewaschen und die Lösung eingedampft. Durch wiederholtes Eindampfen mit abs. Pyridin wurde von Wasser befreit. Dann wurde in 4,5 ml abs. Pyridin gelöst, und es wurden 279 mg (5710 OD<sub>280</sub>, 2 Äquiv.) pG $\ddot{P}$ (iB) (4) und 507 mg DCC (10 Äquiv.) zugegeben. Nach 5 Tagen Rühren bei 23° im Dunkeln wurde das inzwischen dunkelbraun gewordene Gemisch mit 5 ml Pyridin verdünnt und mit 5 ml Wasser hydrolysiert. Nach 18 Std. Rühren wurde vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, der Niederschlag mit 5 ml 50proz. Pyridin gewaschen und die Lösung nach Verdünnen mit Wasser auf 120 ml 2mal mit 80 ml Äther extrahiert. Die organischen Phasen wurden je 2mal mit 80 ml Wasser gewaschen, auf 10 ml eingengt, mit 10 ml Pyridin verdünnt und auf 0° gekühlt. Dann wurden 20 ml auf 0° vorgekühlte 2N NaOH zugegeben. Durch Zugabe von 8 ml Äthanol wurde die Lösung homogen. Nach 25 Min. bei 0° wurde mit 60 ml Pyridinium-Dowex-50 neutralisiert, über eine Säule von Dowex abfiltriert und die Säule mit 100 ml Wasser/Pyridin/Äthanol 8:1:1 gewaschen. Die orange Lösung wurde eingengt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (100  $\times$  1 cm) gebracht und die Säule mit einem Gradienten von 10 l 0-0,25M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  gewaschen. Es wurden nacheinander eluiert (\* bedeutet: bzgl. des eingesetzten pG $\ddot{P}$ (iB)): Fr. 52-55: G $\ddot{P}$ -5'-pp-5'-G $\ddot{P}$  (2%\*); Fr. 121-125:  $pI_d$  (3; 1%); Fr. 137-154: pG $\ddot{P}$  (43%\*); Fr. 166-175: pG $\ddot{P}$  (4%\*); Fr. 216-244 (0,130-0,146M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ):  $pI_d$ pG $\ddot{P}$  (16; 54%); Fr. 258-272:  $pI_d$ pG $\ddot{P}$  (18; 5%). Die Fr. 216-244, die 1965 OD<sub>280</sub> von 16 enthielten, wurden vereinigt und eingedampft. Lyophilisieren ergab 98,5 mg DC.-einheitliches (A, B, C) 16 als farblose Flocken. - UV. (Wasser): 260, 281, 225 Sch.;  $\epsilon_{281}/\epsilon_{260} = 0,89$ ,  $\epsilon_{300}/\epsilon_{260} = 0,56$ .

10. 1-(5'-O-Phosphoryl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-desoxyadenosin ( $pI_d$ pA $\ddot{P}$ , 17). 1210 OD<sub>280</sub>-Einheiten (CNET) $pI_d$  (15) wurden mit 306 mg (11340 OD<sub>280</sub>; 1,5 Äquiv.) pA $\ddot{P}$ (Ac) (6) und 755 mg (10 Äquiv.) DCC wie in Kap. 9 umgesetzt. Nach Auf-

arbeitung und Chromatographie wie in Kap. 9 wurde erhalten (\* bedeutet: bzgl. des eingesetzten  $pA_3^z(Ac)$ ): Fr. 104-113:  $pI_d$  (3; 38%); Fr. 132-150:  $pA_3^z$  (45%\*); Fr. 151-162:  $A_3^z\text{-}5'\text{-pp-}5'\text{-}A_3^z$  (4%\*); Fr. 195-205:  $pI_d pA_d$  (19; 1%); Fr. 218-235 (0,131-0,141M  $NH_4HCO_3$ ):  $pI_d pA_3^z$  (17; 34%). Eindampfen der Fr. 218-235, die 3000 OD<sub>282</sub> von 17 enthielten, und Lyophilisieren ergaben 58 mg DC.-reines (A, B, C) 17 als farblose Flocken. - UV. (Wasser): 282, 243 min., 226 Sch.;  $\epsilon_{243}/\epsilon_{282} = 0,46$ ,  $\epsilon_{226}/\epsilon_{282} = 0,72$ ,  $\epsilon_{300}/\epsilon_{282} = 0,59$ .

11. *1-(5'-O-Phosphoryl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-2'-desoxy-guanosin* ( $pI_d pG_d$ , 18). 589 OD<sub>280</sub>-Einheiten (29,5 mg)  $pI_d pG_d^z$  (16) wurden in 2 ml konz. Ammoniak und 1 ml Pyridin 3 Tage bei 23° im Dunkeln stehengelassen. Die Lösung wurde eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und auf eine *DEAE-Sephadex*-Säule (40×1 cm) gebracht. Die Säule wurde mit einem Gradienten von 6 l 0-0,15M  $NH_4HCO_3$  gewaschen. Die Fr. 162-180 (0,099-0,110M  $NH_4HCO_3$ ) enthielten 400 OD<sub>280</sub> (94%)  $pI_d pG_d$  (18). Eindampfen und Lyophilisieren ergaben 24,5 mg DC.-einheitliches (A, B, C, E) 18 als farblose Flocken. - UV. (Wasser): 254, 231, 271-276 Sch., 301;  $\epsilon_{231}/\epsilon_{254} = 0,63$ ,  $\epsilon_{271}/\epsilon_{254} = 0,82$ ,  $\epsilon_{280}/\epsilon_{254} = 0,80$ ,  $\epsilon_{301}/\epsilon_{254} = 0,42$ .

12. *1-(5'-O-Phosphoryl-3'-O-phosphoryl-2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridon-(3'-5')-2'-desoxy-adenosin* ( $pI_d pA_d$ , 19). 50,2 mg (1530 OD<sub>280</sub>)  $pI_d pA_d^z$  (17) in 8 ml konz. Ammoniak und 2 ml Pyridin wurden wie in Kap. 11 behandelt und mit einem Gradienten von 6 l 0-0,18M  $NH_4HCO_3$  chromatographiert (Säule 100×1 cm). Die vereinigten Fr. 178-201 (0,128-0,145M  $NH_4HCO_3$ ), die 851 OD<sub>261</sub> (84%) enthielten, wurden eingedampft. Lyophilisieren ergab 40,0 mg DC.-einheitliches (A, B, C) 19 als farblose Flocken. - UV. (Wasser): 261, 301, 226 Sch.;  $\epsilon_{301}/\epsilon_{261} = 0,39$ ,  $\epsilon_{226}/\epsilon_{261} = 0,53$ ,  $\epsilon_{280} = \epsilon_{301}$ .

13. *Enzymatische Spaltungen* (vgl. theoret. Teil). Die Herstellung der Enzym- und Substratlösungen, die Durchführung der Versuche und die Trennung der Spaltprodukte durch Papierchromatographie erfolgten wie früher beschrieben [1] [29].

*Enzyme*. Es wurden verwendet: Schlangengiftphosphodiesterase (E.C.3.1.4.1., Venom Phosphodiesterase I, *Crotalus adamanteus*, *Worthington Biochemical Corporation*); Milzphosphodiesterase (E.C.3.1.4.1., Phosphodiesterase II, *Bovine Spleen*, *PL Biochemical Inc.*); alkalische Phosphatase (E.C.3.1.3.1., *Escherichia coli*, *Worthington Biochemical Corporation*); Schlangengiftphosphodiesterase mit 5'-Nucleotidasenaktivität (E.C.3.1.4.1., Venom Phosphodiesterase I, *Crotalus atrox*, *PL Biochemical Inc.*).

*Spaltung mit Phosphodiesterase I*. Die Dinucleosidphosphate  $I_d pG_d$  (9) und  $I_d pA_d$  (11) wurden vollständig zu  $I_d$  und  $pG_d$  bzw.  $I_d$  und  $pA_d$  gespalten. Analog wurden die Dinucleotide  $pI_d pG_d$  (18) und  $pI_d pA_d$  (19) zu den Mononucleotiden  $pI_d$  und  $pG_d$  bzw.  $pI_d$  und  $pA_d$  abgebaut (Tab. 1).

*Spaltung mit Phosphodiesterase II*. Die Dinucleosidphosphate  $I_d pG_d$  und  $I_d pA_d$  wurden jeweils zu  $I_d p$  und  $G_d$  bzw.  $I_d p$  und  $A_d$  gespalten. Infolge einer Enzymverunreinigung [30] wurde  $A_d$  weiter zu Desoxyinosin abgebaut (Tab. 1).

Tabelle 1. *Enzymatische Spaltungen*

Enzym	Substrat	Spaltprodukte	gef. Verhältnis
Phosphodiesterase I	$I_d pG_d$	$I_d$ , $pG_d$	1:1,03
	$I_d pA_d$	$I_d$ , $pA_d$	1:0,90
	$pI_d pG_d$	$pI_d$ , $pG_d$	1:0,95
	$pI_d pA_d$	$pI_d$ , $pA_d$	1:1,02
Phosphodiesterase II	$I_d pG_d$	$I_d p$ , $G_d$	1:1,03
	$I_d pA_d$	$I_d p$ , $I_d^A$	1:0,99

*Spaltung mit alkalischer Phosphatase*. Bei den Dinucleotiden  $pI_d pG_d$  (18) und  $pI_d pA_d$  (19) wurden die Phosphomonoestergruppen vollständig abgespalten, was zu den Dinucleosidphosphaten

$\Pi_d$ pG<sub>d</sub> (9) bzw.  $\Pi_d$ pA<sub>d</sub> (11) führte. Die Phosphorylierungsprodukte p $\Pi_d$  (3) und pA<sub>d</sub> (14) wurden zu den Nucleosiden  $\Pi_d$  und A<sub>d</sub> abgebaut.

*Spaltung mit 5'-Nucleotidase.* Durch die 5'-Nucleotidase, die als Verunreinigung in einer Phosphodiesterase I enthalten war, wurde die 5'-Phosphatgruppe in p $\Pi_d$  und pA<sub>d</sub> vollständig abgespalten und damit die Selektivität der Phosphorylierung bewiesen. Der Abbau erfolgte innert 20 Min. bei 37°.

Spaltprodukte wurden papierchromatographisch getrennt, durch mehrmaliges Eluieren mit Wasser aus dem Papier extrahiert und die Basenzusammensetzung (theoretisch 1:1) UV.-spektroskopisch überprüft (Tab. 1).

Tabelle 2. *R<sub>f</sub>*-Werte

Substanz	Dünnschichtchromatogramme FlieBmittel					Papierchromatogramme FlieBmittel A
	A	B	C	D	E	
$\Pi_d$ (1)	0,67		0,56	0,65		0,73
(MeOTr) $\Pi_d$ (2)	0,87	0,75	0,80	0,75		
p $\Pi_d$ (3)	0,20	0,20	0,36		0,37	0,22
$\Pi_d$ p	0,22	0,20	0,36			0,29
(CNEt)p $\Pi_d$ (15)	0,56	0,71	0,42		0,54	
G <sub>d</sub>		0,70				0,36
pG <sub>d</sub>	0,08	0,30	0,15		0,30	0,06
pG <sub>d</sub> <sup>ib</sup> (4)	0,26	0,67	0,50	0,20	0,50	
A <sub>d</sub>	0,70	0,71				0,56
pA <sub>d</sub> (14)	0,18	0,20	0,28			0,08
pA <sub>d</sub> <sup>bz</sup> (Ac) (6)	0,36	0,38	0,47			
(MeOTr) $\Pi_d$ pG <sub>d</sub> <sup>ib</sup> (5)	0,59	0,77	0,50	0,55		
(MeOTr) $\Pi_d$ pG <sub>d</sub> (8)	0,54	0,68		0,30		
$\Pi_d$ pG <sub>d</sub> (9)	0,48	0,62				0,26
(MeOTr) $\Pi_d$ pA <sub>d</sub> <sup>bz</sup> (7)	0,66	0,81	0,55			
(MeOTr) $\Pi_d$ pA <sub>d</sub> (10)	0,61		0,40			
$\Pi_d$ pA <sub>d</sub> (11)	0,56	0,70	0,38			0,35
p $\Pi_d$ pG <sub>d</sub> <sup>ib</sup> (16)	0,22	0,45	0,30		0,47	
p $\Pi_d$ pG <sub>d</sub> (18)	0,14	0,22	0,15			
p $\Pi_d$ pA <sub>d</sub> <sup>bz</sup> (17)	0,24	0,24	0,36			
p $\Pi_d$ pA <sub>d</sub> (19)	0,14	0,15	0,13			
I <sub>d</sub>	0,50					0,39

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] N. Cerletti & Ch. Tamm, *Helv.* 60, 1182 (1977).
- [2] F. Waldmeier, Dissertation, Basel 1977.
- [3] U. Séquin & Ch. Tamm, *Helv.* 55, 1196 (1972).
- [4] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Pure appl. Chemistry* 40, 277 (1974); J. H. Van de Sande, M. H. Caruthers, A. Kumar & H. G. Khorana, *J. biol. Chemistry* 251, 571 (1976).
- [5] N. Cerletti, Dissertation, Basel 1976.
- [6] J. Gregor, U. Séquin & Ch. Tamm, *Helv.* 58, 712 (1975).
- [7] N. Cerletti & Ch. Tamm, *Heterocycles* 5, 245 (1976).
- [8] P. O. P. Ts' O, 'Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry', Vol. II, Acad. Press, N.Y. 1974, S. 47; H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 3821 (1963).
- [9] P. T. Gilham & H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 6212 (1958).
- [10] R. J. Zhdanov & S. M. Zhenodarova, *Synthesis* 1975, 222.
- [11] H. Kössel & H. Seliger, *Fortschr. Chem. org. Naturst.* 32, 297 (1975).
- [12] V. Amarnath & A. D. Brown, *Chem. Rev.* 77, 183 (1977).
- [13] P. Cashion, K. Porter, T. Cadger, G. Sathe, T. Tranquilla, H. Notman & E. Jay, *Tetrahedron Letters* 1976, 3769; F. Ramirez, E. Evangelidou-Tsolis, A. Jankowski & J. F. Marecek, *J. org. Chemistry* 42, 3144 (1977); R. Arentzen & C. B. Reese, *J. chem. Soc. Perkin I* 1977, 445.

- [14] *W. Büchi & H. G. Khorana*, *J. mol. Biol.* **72**, 251 (1972).  
[15] *H. Weber & H. G. Khorana*, *J. mol. Biol.* **72**, 219 (1972).  
[16] *D. G. Knorre & V. F. Zarytova*, *Nucl. Acids Res.* **3**, 2709 (1976).  
[17] *H. Köster & W. Kaiser*, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 336.  
[18] *H. Schott & H. Kössel*, *J. Amer. chem. Soc.* **95**, 3778 (1973).  
[19] *R. K. Ralph & H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 2926 (1961).  
[20] *S. A. Narang & H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 2988 (1965).  
[21] *H. Schaller & H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 3828 (1963).  
[22] *A. Franke, K. H. Scheit & F. Eckstein*, *Chem. Ber.* **101**, 2998 (1968).  
[23] *G. M. Tener*, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 159 (1961).  
[24] *G. A. LePage, Y. T. Lin, R. E. Orth & J. A. Gottlieb*, *Cancer Res.* **32**, 2441 (1972); *S. S. Cohen*, *Biochem. Pharmacol.* **24**, 1929 (1975).  
[25] *L. A. Slotin*, *Synthesis* **1977**, 623.  
[26] *M. Yoshikawa, T. Kato & T. Takenishi*, *Bull. chem. Soc. Japan* **42**, 3505 (1969); *T. Sowa & S. Ouchi*, *ibid.* **48**, 2084 (1975).  
[27] *G. R. Revankar, J. H. Huffman, L. B. Allen, R. W. Sidwell, R. K. Robins & R. L. Tolman*, *J. med. Chemistry* **18**, 721 (1975); *C. I. Hong, G. L. Tritzsch, A. Mittelman, P. Hebborn & G. B. Chheda*, *ibid.* **18**, 465 (1975).  
[28] *P. O. P. Ts'ao*, 'Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry', Vol. II, Acad. Press, N.Y. 1974, S. 118, S. 323.  
[29] *U. Séquin*, *Helv.* **57**, 68 (1974).  
[30] *K. K. Ogilvie & R. L. Letsinger*, *Biochem. biophysics Res. Commun.* **30**, 273 (1968).  
[31] *A. Kumar & H. G. Khorana*, *J. Amer. chem. Soc.* **91**, 2743 (1969).

---

## 161. Cyclooct-1-en-5-yne. Preparation, Spectroscopic Characteristics and Chemical Reactivity<sup>1)</sup>

by **Werner Leupin** and **Jakob Wirz**

Physikalisch-chemisches Institut der Universität Basel, Klingelbergstrasse 80, CH-4056 Basel, Switzerland

(22. III. 78)

---

### Summary

Cyclooct-1-en-5-yne (**3**) has been obtained as an isolable, but highly reactive hydrocarbon by oxidation of cyclooct-5-ene-1,2-dihydrazone with lead tetraacetate (*Scheme 2*). Information regarding the structure and conformational mobility of **3** has been gained from the analysis of its <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR. spectra and was found to agree with the results of force field calculations. Photolysis (206 nm) of **3** in solution has induced cleavage to butatriene and butadiene. The first band in the photoelectron spectrum of **3** (I<sub>v</sub> 9.10 eV) is attributed to ionization from a rather delocalized orbital with predominant weight of the double bond p-AO's. Nevertheless, the high reactivity of **3** stems from the strained triple bond as evidenced by the reaction products obtained by pyrolysis, oxidation, *Diels-Alder* addition, and 1,3-dipolar addition (*Scheme 4*).

---

<sup>1)</sup> Presented at the Swiss Chemical Society meeting, 7.10.1977.