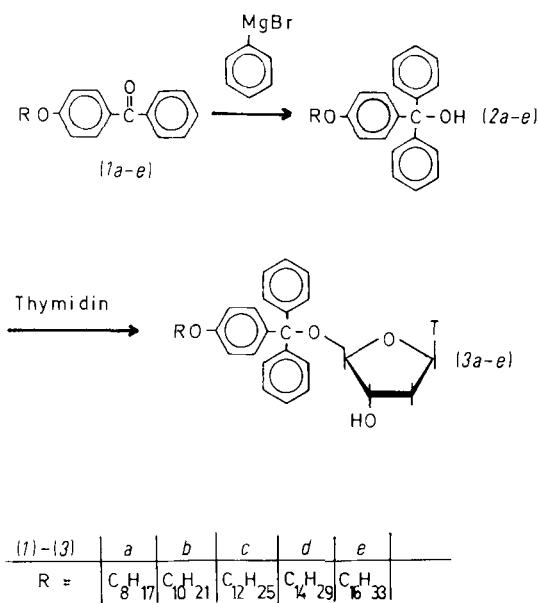


## Neue hydrophobe Schutzgruppen für die chemische Oligonucleotidsynthese<sup>[\*\*]</sup>

Von Hans-Helmut Görtz und Hartmut Seliger<sup>[\*]</sup>

Für die chemische Synthese von Polynukleotidfragmenten nach dem Triesterverfahren<sup>[1,2]</sup> spielt die Chromatographie zur Reinigung geschützter Zwischenstufen und zur Isolierung des ungeschützten Endprodukts eine bedeutende Rolle<sup>[2,3]</sup>. Das chromatographische Verhalten der Oligomere kann hierbei in bestimmten Grenzen durch Schutzgruppen variiert werden, wobei sich die Gesamtpolarität des Moleküls in der Regel lediglich unspezifisch ändert. Wir haben als neuen Typ hydrophober Schutzgruppen 4-Alkoxytritylgruppen für das 5'-Ende von Oligonukleotiden verwendet<sup>[4]</sup>. Hierzu wurden 4-Alkoxytritanole (2a-e) durch Grignard-Reaktion aus (1a-e) hergestellt und über die Tritylchloride mit Thymidin zu (3a-e) umgesetzt.



Wie erwartet sind die R<sub>f</sub>-Werte der 5'-O-(4-Alkoxytrityl)thymidine (3a-e) an Silicagel etwas höher, an RP-2 et-

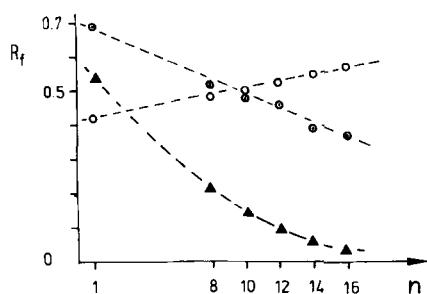


Abb. 1. Abhängigkeit der R<sub>f</sub>-Werte von der Alkylkettenlänge n der Verbindungen (3) [n = 8, 10, 12, 14, 16 = (3a, b, c, d, e)]. ○: Silicagel 60 (Merck), Chloroform/Methanol 9:1; □: Silicagel RP-2 (Merck), Aceton/Wasser 75:25; ▲: Silicagel KC<sub>18</sub> (Whatman), Aceton/Wasser 75:25.

was niedriger als die R<sub>f</sub>-Werte von 5'-(4,4'-Dimethoxytrityl)thymidin. Diese Veränderungen spiegeln die abnehmende Gesamtpolarität wider. Anders verhalten sich (3a-e) jedoch in der RP-(Reversed Phase)-Chromatographie an C<sub>18</sub>-Phase: Hier führt eine offenbar spezifische Wechselwirkung zwischen den Alkylketten von Sorbens und Sorbat zu mit der Kettenlänge drastisch sinkenden R<sub>f</sub>-Werten in der Dünnschichtchromatographie (Abb. 1) und steigenden Retentionszeiten in der HPLC (Abb. 2).

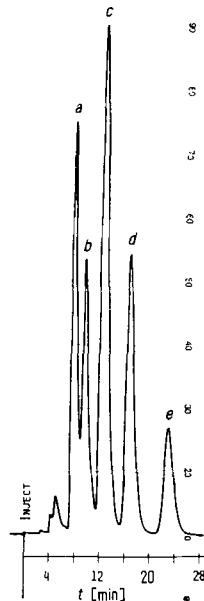


Abb. 2. HPLC-Trennung der Verbindungen (3a-e). Säule: μ-Bondapak C<sub>18</sub> (Waters), Laufmittel: 2-Propanol/Methanol/Wasser 6:2:2, Fluß: 1 mL/min, Druck: 130 bar, Detektion: UV<sub>254</sub>.

Bei den Oligonukleotid-phosphotriestern (4)-(16) (Tabelle 1) zeigen die Derivate mit 4-Hexadecyloxytrityl-(C<sub>16</sub>Tr-)Gruppe [(6), (8), (11), (13) und (16)] das gleiche charakteristische Verhalten in der RP-18-Chromatographie wie die Monomere (3). Für die präparative Anwendung ist vor allem der große R<sub>f</sub>-Unterschied zwischen den C<sub>16</sub>Tr-Derivaten und den entsprechenden Verbindungen mit freier 5'-OH-Gruppe interessant, der, unabhängig von Kettenlänge und Sequenz, eine leichte und vollständige Trennung der beiden Verbindungstypen in der HPLC anzeigt. Bei den bisher gebräuchlichen 4-Methoxy- oder 4,4'-Dimethoxytrityl-(DMTr-)Derivaten kann aus dem Reaktionsgemisch von Oligonukleotid-Kondensierungen zwar die Ausgangskomponente mit 3'-terminaler Phosphatladung problemlos abgetrennt werden, die weitgehende Entfernung des Oligonukleotids mit freier 5'-OH-Gruppe erfordert dagegen eine umständliche Nachbehandlung<sup>[5]</sup>. Zur Verdeutlichung vergleiche man in Tabelle 1 die R<sub>f</sub>-Werte von Oligonukleotid-Sequenzen, die eine terminale C<sub>16</sub>Tr- [(8), (13), (16)] oder DMTr-Gruppe [(7), (12), (15)] enthalten, mit denen ihrer Vorstufen (4), (9) und (14).

Geht man davon aus, daß der Vorteil der Triestermethode zum großen Teil auf der schnellen und einfachen Entfernung der Reaktionsvorstufen beruht, dann dürfte die Möglichkeit zur selektiven Abtrennung auch der Hydroxykomponente die Effizienz des Verfahrens wesentlich erhöhen. Dabei macht die Analogie der C<sub>16</sub>Tr-Gruppe zur 4-Methoxytritylgruppe, was Einführungs- und Abspaltungsbedingungen betrifft, keinerlei Änderung der Synthesestrategie erforderlich.

[\*] Prof. Dr. H. Seliger, Dr. H.-H. Görtz  
Sektion Polymere der Universität  
Oberer Eselsberg, D-7900 Ulm

[\*\*] Synthesen mit Nukleinsäurebausteinen, 9. Mitteilung. - 8. Mitteilung:  
H. Seliger, B. Haas, M. Holupirek, T. Knäble, G. Tödling, M. Philipp,  
Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 7, 191 (1980).

Tabelle 1. R<sub>f</sub>-Werte der Verbindungen (4)–(16) [a] in den Systemen A, B und C [b].

Verb.	A	B	C
(4) dTpTpT <sub>Bz</sub>	0.31	0.81	0.68
(5) DMTrdTpTpTp(CE)	0.41	0.72	0.50
(6) C <sub>16</sub> TrdTpTpTp(CE)	0.48	0.52	0.19
(7) DMTrdTpTpTpTpT <sub>Bz</sub>	0.35	0.69	0.44
(8) C <sub>16</sub> TrdTpTpTpTpT <sub>Bz</sub>	0.45	0.52	0.18
(9) dG <sup>bz</sup> pA <sup>bz</sup> p(CE)	0.19/0.30 [c]	0.92	0.97
(10) DMTrdG <sup>bz</sup> pA <sup>bz</sup> p(CE)	0.57/0.65 [c]	0.81/0.83 [c]	0.89/0.91 [c]
(11) C <sub>16</sub> TrdG <sup>bz</sup> pA <sup>bz</sup> p(CE)	0.63/0.69 [c]	0.36/0.39 [c]	0.24/0.29 [c]
(12) DMTrdG <sup>bz</sup> pA <sup>bz</sup> pG <sup>bz</sup> pA <sup>bz</sup> p(CE)	0.40	0.76	0.81
(13) C <sub>16</sub> TrdG <sup>bz</sup> pA <sup>bz</sup> pG <sup>bz</sup> pA <sup>bz</sup> p(CE)	0.48	0.40	0.28
(14) dTpC <sup>bz</sup> pTpC <sup>bz</sup>	0.73	0.89	0.96
(15) DMTrdG <sup>bz</sup> pA <sup>bz</sup> pG <sup>bz</sup> pA <sup>bz</sup> pTpC <sup>bz</sup> pTpC <sup>bz</sup>	0.56	0.86	0.87
(16) C <sub>16</sub> TrdG <sup>bz</sup> pA <sup>bz</sup> pG <sup>bz</sup> pA <sup>bz</sup> pTpC <sup>bz</sup> pTpC <sup>bz</sup>	0.72	0.33	0.21

[a] p = p-Chlorphenylphosphoryl; CE = β-Cyanethyl; DMTr = 4,4'-Dimethoxytrityl, C<sub>16</sub>Tr = 4-Hexadecyloxytrityl; [b] A: Silicagel 60 (Merck); Chloroform/Methanol 9:1; B: Silicagel RP-8 (Merck); Aceton/Wasser 85:15; C: Silicagel RP-18 (Merck); Aceton/Wasser 85:15. [c] Diastereomerenpaare.

### Arbeitsvorschrift

(1e): Zu 0.2 mol Natriummethanolat in 200 mL Ethanol werden 39.6 g (0.2 mol) 4-Hydroxybenzophenon, 61.1 g (0.2 mol) 1-Bromhexadecan und 1 Spatelspitze KI gegeben. Nach 5 h Erhitzen unter Rückfluß wird das Ethanol im Vakuum entfernt und der Rückstand in 100 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/1 N NaOH aufgenommen. Die wäßrige Phase wird abgetrennt und zweimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit wenig Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Vakuumdestillation des Rückstandes (Luftkühler!) ergibt 45.6 g (54%) einer hellbeigen Flüssigkeit, K<sub>p</sub> = 255 °C/1 Torr, die beim Abkühlen erstarrt (F<sub>p</sub> = 73 °C)<sup>[6]</sup>.

(2e): Zu einer Lösung von 0.125 mol Phenylmagnesiumbromid in 50 mL Ether werden innerhalb von 30 min 0.1 mol (1e) in 50 mL Tetrahydrofuran (THF) getropft. Nach der Zugabe wird 1 h zum Sieden erhitzt und nach dem Erkalten auf Eis/Salzsäure gegossen. Die organische Phase wird abgetrennt, die wäßrige noch zweimal mit je 50 mL THF extrahiert. Nach Waschen mit Wasser, NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und wieder Wasser werden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Der ölige, in Pentan aufgenommene Rückstand kristallisiert bei –20 °C; Ausbeute 37.6 g (75%), F<sub>p</sub> = 56–58 °C<sup>[6]</sup>.

(3e): 750 mg (1.5 mmol) (2e) werden in 10 mL Benzol mit 3 mL Acetylchlorid 1 h unter Rückfluß erhitzt, dann eingeengt und dreimal mit je 10 mL Benzol zur Trockne eingeengt. Zum zurückgebliebenen, in 3 mL wasserfreiem Pyridin aufgenommenen Öl gibt man 242 mg (1 mmol) Thymidin und 2 mg 4-Dimethylaminopyridin. Nach der Umsetzung (ca. 2 h, Kontrolle durch Dünnschichtchromatographie) und Zusatz von 10 mL 5proz. NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung wird zweimal mit je 10 mL Chloroform extrahiert. Die getrocknete organische Phase wird eingeengt, nacheinander je zweimal mit Toluol, Ethanol und Chloroform zur Trockne eingeengt, in wenig Chloroform gelöst und an Silicagel (Merck 7733) chromatographiert (Säule 1.5 × 7 cm, Laufmittel Chloroform). Die Produktfraktionen werden eingedampft. Durch zweimaliges Einengen mit Pentan wird festes (3e) erhalten; Ausbeute 545 mg (75%)<sup>[6]</sup>.

Eingegangen am 17. Dezember 1980 [Z 807a]

[1] H. Seliger, T. C. Bach, E. Happ, M. Holupirek, E. H. Teufel, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 360, 1044 (1979).

[2] S. A. Narang, R. Brousseau, H. M. Hsiung, J. J. Michniewicz, Methods Enzymol. 65, 610 (1980); S. A. Narang, H. M. Hsiung, R. Brousseau, ibid. 68, 90 (1979).

[3] H. Seliger, M. Holupirek, T. C. Bach, E. Happ, Vorträge, Königsteiner Chromatographie-Tage, Bad Homburg, 1979, 132.

[4] H. Seliger, H.-H. Götz, Vorträge, Königsteiner Chromatographie-Tage, Bad Homburg, 1979, 304.

[5] J. Stawinski, T. Hozumi, S. A. Narang, C. P. Bahl, R. Wu, Nucleic Acids Res. 4, 353 (1977).

[6] (1e), IR: 2960, 2850, 1640, 1600, 1575, 1500, 1250 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>/TMS): δ = 0.88 (t, 3 H), 1.28 (s, 26 H), 1.79 (t, 2 H), 4.00 (t, 2 H), 6.85–7.85 (m, 9 H); (2e): IR: 3580, 3480, 3060, 2920, 2850, 1610, 1580, 1510, 1245 cm<sup>-1</sup>; (3e): IR: 3400, 3050, 2920, 2850, 1700, 1600, 1500, 1250 cm<sup>-1</sup>.

### Spezifische Produktaussonderung bei Träger-Oligonucleotidsynthesen nach dem Triesterverfahren<sup>[\*\*]</sup>

Von Hartmut Seliger und Hans-Helmut Götz<sup>[†]</sup>

Auf der Suche nach vereinfachten Synthesen für Oligonucleotide spezifischer Sequenz steht die Synthese an polymeren Trägern im Vordergrund des Interesses. Bei unvollständiger Verlängerung der am Träger immobilisierten Ketten entsteht jedoch ein Gemisch homologer Sequenzfragmente, aus dem das gewünschte Produkt nur mit Mühe hinreichend rein erhalten werden kann. Wir haben Wege beschrieben, um die Produktkette, d. h. in der Regel die längste Sequenz, durch selektive Affinitätsmarkierung von allen Nebenprodukten abzutrennen<sup>[1]</sup>. Dieses Verfahrensschema haben wir nunmehr auf Träger-Oligonucleotidsynthesen nach der Triestermethode<sup>[2]</sup> angewendet. Bei anderen Triester-Trägersynthesen<sup>[3]</sup> ist dieser Aspekt nicht berücksichtigt worden.

Als neue Trägermaterialien stellten wir „Popcorn“-Copolymerisate<sup>[4]</sup> aus Styrol und 5'-tritylierten Desoxynucleosid-3'-p-vinylbenzoaten (1) her [Verhältnis (1):Styrol ≈ Nucleosidbeladung des Trägermaterials = 0.09 mmol/g (2a) und 0.02 mmol/g (2b)] (Schema 1).

Mit dem Träger wurde ein Kettenverlängerungsschritt durchgeführt, bei dem 1. mit Säure die 5'-OH-Schutzgruppe entfernt, 2. mit 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)thymi-

[†] Prof. Dr. H. Seliger, Dr. H.-H. Götz  
Sektion Polymere der Universität  
Oberer Eselsberg, D-7900 Ulm

[\*\*] Trägersynthesen, 9. Mitteilung. – Als 8. Mitteilung gilt [1].