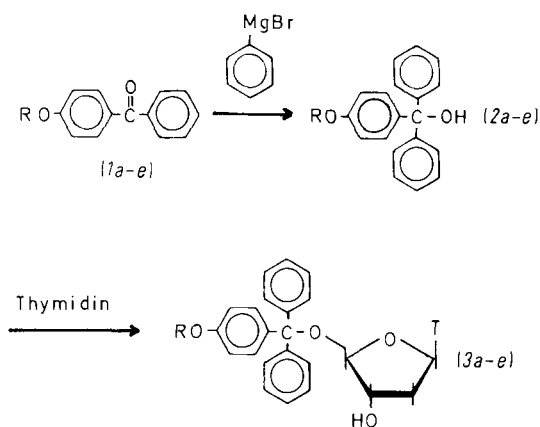


Neue hydrophobe Schutzgruppen für die chemische Oligonucleotidsynthese^[**]

Von Hans-Helmut Görtz und Hartmut Seliger^[*]

Für die chemische Synthese von Polynucleotidfragmenten nach dem Triesterverfahren^[1,2] spielt die Chromatographie zur Reinigung geschützter Zwischenstufen und zur Isolierung des ungeschützten Endprodukts eine bedeutende Rolle^[2,3]. 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 Oligonucleotiden verwendet^[4]. Hierzu wurden 4-Alkoxytritanole (2a-e) durch Grignard-Reaktion aus (1a-e) hergestellt und über die Tritylchloride mit Thymidin zu (3a-e) umgesetzt.



(1)-(3)	a	b	c	d	e
R =	C ₈ H ₁₇	C ₁₀ H ₂₁	C ₁₂ H ₂₅	C ₁₄ H ₂₉	C ₁₆ H ₃₃

Wie erwartet sind die R_f -Werte der 5'-O-(4-Alkoxytrityl)thymidine (3a-e) an Silicagel etwas höher, an RP-2 et-

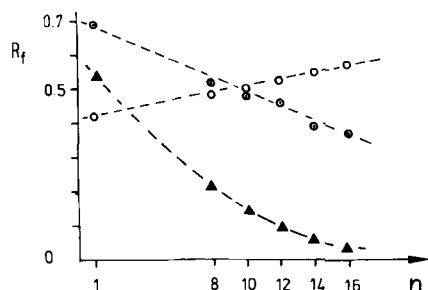


Abb. 1. Abhängigkeit der R_f -Werte von der Alkylkettenlänge n der Verbindungen (3) [$n=8, 10, 12, 14, 16 \equiv (3a, b, c, d, e)$]. ○: Silicagel 60 (Merck), Chloroform/Methanol 9:1; ●: Silicagel RP-2 (Merck), Aceton/Wasser 75:25; ▲: Silicagel KC₁₈ (Whatman), Aceton/Wasser 75:25.

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

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

was niedriger als die R_f -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 C₁₈-Phase: Hier führt eine offenbar spezifische Wechselwirkung zwischen den Alkylketten von Sorbens und Sorbat zu mit der Kettenlänge drastisch sinkenden R_f -Werten in der Dünnschichtchromatographie (Abb. 1) und steigenden Retentionszeiten in der HPLC (Abb. 2).

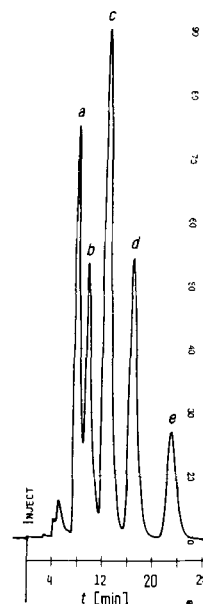


Abb. 2. HPLC-Trennung der Verbindungen (3a-e). Säule: μ -Bondapak C₁₈ (Waters), Laufmittel: 2-Propanol/Methanol/Wasser 6:2:2, Fluß: 1 mL/min, Druck: 130 bar, Detektion: UV₂₅₄.

Bei den Oligonucleotid-phosphotriestern (4)-(16) (Tabelle 1) zeigen die Derivate mit 4-Hexadecyloxytrityl-(C₁₆Tr-)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_f -Unterschied zwischen den C₁₆Tr-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 Oligonucleotid-Kondensationen zwar die Ausgangskomponente mit 3'-terminaler Phosphatladung problemlos abgetrennt werden, die weitgehende Entfernung des Oligonucleotids mit freier 5'-OH-Gruppe erfordert dagegen eine umständliche Nachbehandlung^[5]. Zur Verdeutlichung vergleiche man in Tabelle 1 die R_f -Werte von Oligonucleotid-Sequenzen, die eine terminale C₁₆Tr- [(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 C₁₆Tr-Gruppe zur 4-Methoxytritylgruppe, was Einführungs- und Abspaltungsbedingungen betrifft, keinerlei Änderung der Synthesestrategie erforderlich.

Tabelle 1. R_f -Werte der Verbindungen (4)–(16) [a] in den Systemen A, B und C [b].

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

[a] p = *p*-Chlorphenylphosphoryl; CE = β -Cyanethyl; DMTr = 4,4'-Dimethoxytrityl; C₁₆Tr = 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 Natriumethanolat 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 CH₂Cl₂/1 N NaOH aufgenommen. Die wäßrige Phase wird abgetrennt und zweimal mit CH₂Cl₂ 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, $K_p = 255^\circ\text{C}/1$ Torr, die beim Abkühlen erstarrt ($F_p = 73^\circ\text{C}$)^[6].

(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, NaHCO₃-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%), $F_p = 56\text{--}58^\circ\text{C}$ ^[6].

(3e): 750 mg (1.5 mmol) (2e) werden in 10 mL Benzol mit 3 mL Acetylchlorid 1 h unter Rückfluß erhitzt, dann eingengt und dreimal mit je 10 mL Benzol zur Trockne eingengt. 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. NH₄HCO₃-Lösung wird zweimal mit je 10 mL Chloroform extrahiert. Die getrocknete organische Phase wird eingengt, nacheinander je zweimal mit Toluol, Ethanol und Chloroform zur Trockne eingengt, in wenig Chloroform gelöst und an Silicagel (Merck 7733) chromatographiert (Säule 1.5 \times 7 cm, Laufmittel Chloroform). Die Produktfraktionen werden eingedampft. Durch zweimaliges Einengen mit Pentan wird festes (3e) erhalten; Ausbeute 545 mg (75%)^[6].

Eingegangen am 17. Dezember 1980 [Z 807 a]

[1] H. Seliger, T. C. Bach, E. Happ, M. Holupirek, E. H. Teufel, Hoppe-Seyler's 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. Görtz, 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⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃/TMS): $\delta = 0.88$ (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⁻¹; (3e), IR: 3400, 3050, 2920, 2850, 1700, 1600, 1500, 1250 cm⁻¹.

Spezifische Produktaussonderung bei Träger-Oligonucleotidsynthesen nach dem Triesterverfahren^[**]

Von Hartmut Seliger und Hans-Helmut Görtz^[*]

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^[1]. Dieses Verfahrensschema haben wir nunmehr auf Träger-Oligonucleotidsynthesen nach der Triestermethode^[2] angewendet. Bei anderen Triester-Trägersynthesen^[3] ist dieser Aspekt nicht berücksichtigt worden.

Als neue Trägermaterialien stellten wir „Popcorn“-Copolymerisate^[4] aus Styrol und 5'-tritylierten Desoxynucleosid-3'-*p*-vinylbenzoaten (1) her [Verhältnis (1):Styrol \cong 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. Görtz
Sektion Polymere der Universität
Oberer Eselsberg, D-7900 Ulm

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