

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) DMTrdTpTpTp(CE)	0.41	0.72	0.50
(6) C ₁₆ TrdTpTpTp(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 ^{bz} pA ^{bz} p(CE)	0.19/0.30 [c]	0.92	0.97
(10) DMTrdG ^{bz} pA ^{bz} p(CE)	0.57/0.65 [c]	0.81/0.83 [c]	0.89/0.91 [c]
(11) C ₁₆ TrdG ^{bz} pA ^{bz} p(CE)	0.63/0.69 [c]	0.36/0.39 [c]	0.24/0.29 [c]
(12) DMTrdG ^{bz} pA ^{bz} pG ^{bz} pA ^{bz} p(CE)	0.40	0.76	0.81
(13) C ₁₆ TrdG ^{bz} pA ^{bz} pG ^{bz} pA ^{bz} p(CE)	0.48	0.40	0.28
(14) dTpC ^{bz} pTpC ^{bz}	0.73	0.89	0.96
(15) DMTrdG ^{bz} pA ^{bz} pG ^{bz} pA ^{bz} pTpC ^{bz} pTpC ^{bz}	0.56	0.86	0.87
(16) C ₁₆ TrdG ^{bz} pA ^{bz} pG ^{bz} pA ^{bz} pTpC ^{bz} 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 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 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 °C/1 Torr, die beim Abkühlen erstarrt (F_p = 73 °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 = 56–58 °C^[6].

(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. NH₄HCO₃-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%)^[6].

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⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃/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⁻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 Götz^[†]

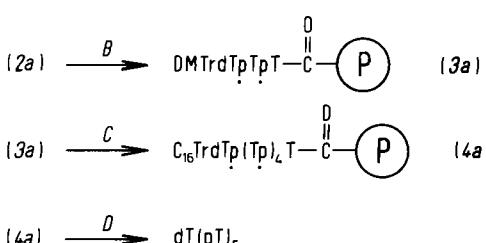
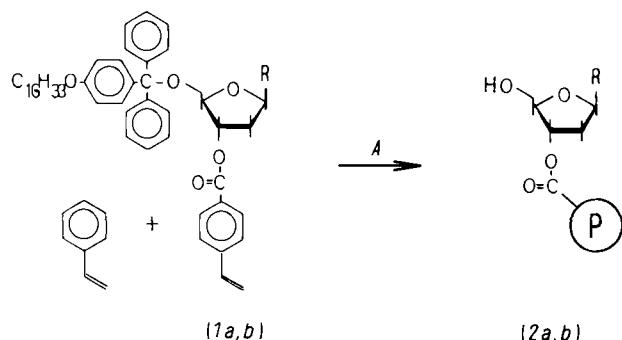
Auf der Suche nach vereinfachten Synthesen für Oligonucleotide spezifischer Sequenz steht die Synthese an polymeren Trägern im Vordergrund des Interesses. Bei unvollständiger Verlängerung der am Träger immobilisierten Ketten entsteht jedoch ein Gemisch homologer Sequenzfragmente, aus dem das gewünschte 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 ≈ 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].



(1)-(4)	a	b
R =	Thymin-1-yl	N ⁴ -Benzoyl-cytosin-1-yl

Schema 1. Synthese von dT(pT)₅ am Träger. A: 1. „Popcorn“-Copolymerisation, 2. H⁺; B: 1. DMTrTp⁻, Mesitylensulfonyltetrazolid, 2. Acetanhydrid, Pyridin, 3. H⁺; C: C₁₆TrdTp⁻, Mesitylensulfonyltetrazolid; D: 1. wäßriges NH₃/Pyridin, 2. HPLC an C₁₈-Phase, 3. H⁺. p = p-Chlorphenylphosphoryl, DMTr = 4,4'-Dimethoxytrityl, C₁₆Tr = 4-Hexadecyloxytrityl.

din-3'-p-chlorphenylphosphat in ca. dreifachem Überschuß kondensiert und 3. unumgesetzte Kettenenden durch Reaktion mit Acetanhydrid in Pyridin blockiert wurden. Dieser Kettenverlängerungsschritt wurde wiederholt. Im dritten Wachstumsschritt wurden die Ketten durch Blockkondensation mit einer Trithymidylateinheit verlängert, die am 5'-Ende mit einer Hexadecyloxytritylgruppe^[5] geschützt war. Nach ammoniakalischer Abspaltung vom Träger wurde das Produktgemisch durch HPLC getrennt. Dabei wurde das Hexanucleotid C₁₆TrdT(pT)₅ spezifisch ausgesondert (Abb. 1, Fraktion P); es erwies sich nach Abspaltung der C₁₆Tr-Gruppe als chromatographisch einheitlich und hinsichtlich seiner Eigenschaften identisch mit trägerfrei synthetisiertem, authentischem Material^[5]. Durch VIS-Spektroskopie säurebehandelter Trägerproben wurden die Ausbeuten in den drei Schritten, jeweils bezogen auf die nächstkürzere Vorstufe, zu 51, 57 und 58% ermittelt.

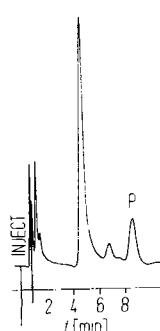


Abb. 1. Abtrennung der Sequenz C₁₆TrdT(pT)₅ (P) von den Nebenprodukten der Trägersynthese durch HPLC. Säule: μ -Bondapak C₁₈ (Waters), Laufmittel: 2-Propanol/Methanol/Wasser 50:15:35, Fluß: 2 mL/min, Druck: 110 bar, Detektion: UV₂₅₄.

Mit dem hier beschriebenen Trägerverfahren können die Vorteile der Triestermethode – generell verbesserte Ausbeuten bei verkürzten Reaktionszeiten und geringem Überschuß eines Reaktanden – bei der Festphasensynthese genutzt werden.

Arbeitsvorschrift

(1a): 725 mg (1 mmol) 5'-O-(4-Hexadecyloxytrityl)thymidin^[5] werden in 5 mL wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 500 mg (3 mmol) 4-Vinylbenzoylchlorid^[6] vermischt. Nach 30 min Rühren setzt man 10 mL 5proz. NH₄HCO₃-Lösung zu und extrahiert zweimal mit je 15 mL Chloroform. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird die organische Phase abgetrennt, das Pyridin durch Abdampfen mit Toluol entfernt und der Rückstand an Silicagel chromatographiert (Merck 7734, Säule 1.5 × 7 cm, Laufmittel Chloroform). Man erhält ca. 700 mg (80%) eines leicht gelben Öls, R_f = 0.73 (Edukt: 0.43; Silicagel, Chloroform/Methanol 9:1); UV: $\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm}$. – (1b) wird analog synthetisiert.

(2): Nucleosid (1) wird aus Benzol lyophilisiert und dann in der stöchiometrischen Menge frisch destillierten Styrols gelöst. Nach Zugabe von 0.2% Divinylbenzol und einigen Popcorn-Polystyrol-Keimen wird unter Stickstoff bis zur Beendigung der Reaktion auf 50°C gehalten (ca. 4 bis 8 h). Das Polymer wird mit Benzol und Ether gründlich gewaschen und im Vakuum getrocknet (Ausbeute nahezu quantitativ). Die Abspaltung der 5'-O-Schutzgruppe erfolgt mit einer 2proz. Lösung von Benzolsulfonsäure in Chloroform/Methanol (7:3; 1 h, 0°C). Nach Waschen mit Methanol, Chloroform und Ether und abermaligem Trocknen ist der Träger gebrauchsfertig.

Eingegangen am 17. Dezember 1980 [Z 807b]

- [1] H. Seliger, M. Holupirek, H.-H. Görtz, Tetrahedron Lett. 1978, 2115.
- [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 (1980); H. Seliger, T. C. Bach, E. Happ, M. Holupirek, E. H. Teufel, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 360, 1044 (1979).
- [3] K. Miyoshi, K. Itakura, Tetrahedron Lett. 1979, 3635; M. J. Gait, M. Singh, R. C. Sheppard, M. D. Edge, A. R. Greene, G. R. Heathcliffe, T. C. Atkinson, C. R. Newton, A. F. Markham, Nucleic Acids Res. 8, 1081 (1980); R. Crea, T. Horn, ibid. 8, 2331 (1980).
- [4] J. W. Breitenbach, B. Herrmann, Angew. Makromol. Chem. 10, 197 (1970); R. L. Letsinger, H. Seliger, Macromolecular Preprints, XXIIIrd International Congress of Pure and Applied Chemistry, Boston 1971, 1261.
- [5] H.-H. Görtz, H. Seliger, Angew. Chem. 93, 708 (1981); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 20, Nr. 8 (1981).
- [6] Y. Iwakura, K. Uno, N. Nakabayashi, T. Kozima, Bull. Chem. Soc. Jpn. 41, 186 (1968).

Reaktion von Dibenzoyldiazomethan mit 1-Diethylaminopropin

Von Rolf Huisgen, Maria Pilar Bosch Verderol,
Alfred Gieren und Viktor Lamm^[*]

Professor Siegfried Hünig zum 60. Geburtstag gewidmet

Diazomalonsäure-dimethylester vereinigt sich mit 1-Diethylaminopropin bei Raumtemperatur zum 3H-Pyrrol-Derivat (1), das sich mit einer Halbreaktionszeit von

[*] Prof. Dr. R. Huisgen, Dr. M. P. Bosch Verderol
Institut für Organische Chemie der Universität
Karlstraße 23, D-8000 München 2
Dr. habil. A. Gieren, Dipl.-Phys. V. Lamm
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Strukturforschung I
D-8033 Martinsried