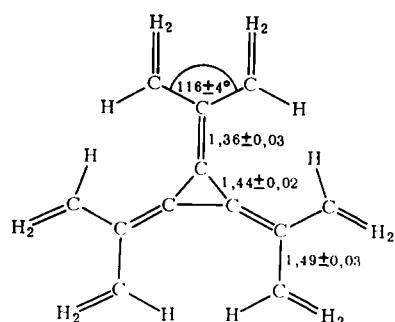


gezogene Reflexe zu erkennen gibt. Diese Unordnung konnte nach einem Vorschlag von Herrn Dr. Köbrich durch 24-stündiges Tempern der Kristalle bei 120 °C beseitigt werden.



Die Bindungslängen und -winkel beim gegenwärtigen Stand der Verfeinerung ($R = 0,16$) zeigt die Abbildung. Angegeben sind Mittelwerte chemisch äquivalenter Bindungen und Winkel und ihre aus der Streuung der Einzelwerte berechneten doppelten Standardfehler ($\pm 2\sigma$). Die Bindungen im Cyclopropanring sind bemerkenswert kurz, was offenbar auf die Wechselwirkung zwischen den drei zusammentreffenden Doppelbindungen zurückzuführen ist.

Eingegangen am 4. April 1968 [Z 764]

[*] Dr. H. Dietrich und Dr. H. Dierks
Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft
1 Berlin 33, Faradayweg 4–6

[1] G. Köbrich u. H. Heinemann, Angew. Chem. 77, 590 (1965);
Angew. Chem. internat. Edit. 4, 594 (1965); G. Köbrich, H. Heinemann u.
W. Zundorf, Tetrahedron 23, 565 (1967).

[2] J. D. Dunitz u. A. Mugnoli, Helv. chim. Acta 49, 1680 (1966).

Synthese von Oligonucleotiden an einem polymeren Träger^[1]

Von F. Cramer und H. Köster [*]

Zur Synthese von Oligonucleotiden an polymeren Trägern wurden lösliche^[1,2] oder vernetzte^[3] Polystyrole verwendet, in denen eine Mono- oder Dimethoxytritylgruppe oder eine Benzoylgruppe^[4] als Anker für die wachsende Kette dienten. Die bisher verwendeten polymeren Träger sind quellbar. Dies bringt folgende Probleme mit sich:

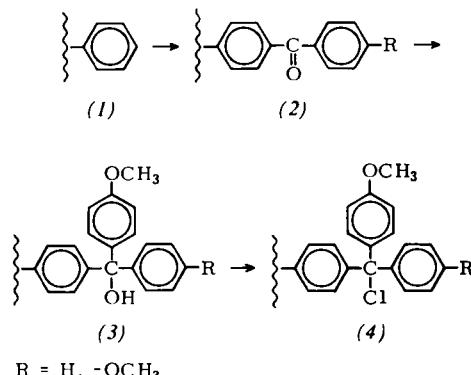
1. Reaktionen sind nur in quellfähigen Lösungsmitteln möglich. Für das Auswaschen von Nebenprodukten und überschüssigen Reagentien kommt nur eine begrenzte Zahl von Solventien in Frage.
2. Viele Substanzen werden vom Gelkäuel hartnäckig festgehalten, so daß zeitraubende Waschvorgänge mit großen Lösungsmittelmengen erforderlich sind. Nur ein lösliches Polystyrol zeigt sich in dieser Hinsicht einem mit 1–2 % Divinylbenzol (Merrifield-Typ) vernetzten Polystyrol überlegen, da es durch Umfällen gereinigt werden kann^[1].
3. Die Verwendung wäßriger Systeme für die selektive Abspaltung von Schutzgruppen^[5] ist nicht immer möglich.
4. Bei Synthesen nach der Diestermethode weist die wachsende Kette pro Phosphodiesterbindung eine Ladung auf. Das Vorliegen einer ionischen Spezies in einem unpolaren Lösungsmittelkäfig dürfte ein Grund für die mit wachsender Kettenlänge auftretende Erschwerung der Abspaltung der Oligonucleotide vom polymeren Träger sein, die wir bei löslichen und mit 1–2 % Divinylbenzol vernetzten Polystyrolen beobachteten. Es mußten Abspaltungsbedingungen gewählt werden, bei denen die labile *N*-glykosidische Bindung der Purinnucleotide teilweise zerstört wird.

Nach systematischer Prüfung verschiedener unlöslicher Polymerarten^[6] verwenden wir als polymere Träger jetzt hochvernetzte, starre Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymerisate,

deren Porosität in weiten Grenzen variiert ist. Diese können in Form unquellbarer Perlen erhalten werden und besitzen folgende Vorteile:

1. Wäßrige Lösungsmittel können verwendet werden; der Träger kann ohne Anwendung eines Gradienten mit allen Lösungsmitteln gewaschen und von löslichen Verunreinigungen befreit werden.
2. Die Kondensationsreaktionen verlaufen ebenso schnell wie bei der trägerfreien Synthese.
3. Die Abspaltung der Oligonucleotidketten wird mit wachsender Länge eher erleichtert als erschwert.
4. Das Polymer ist wegen seiner Perlform und Starrheit mechanisch stabil und ausgezeichnet zu handhaben.

Das Copolymerisat (1) aus Styrol und Divinylbenzol wurde in Nitrobenzol einer Friedel-Crafts-Reaktion mit Benzoyl- oder Anisoylchlorid unterworfen und das polymere Keton (2) anschließend mit *p*-Bromanisol quantitativ grignardiert (3). Dann wurde mit Benzol/Acetylchlorid durch Kochen unter Rückfluß oder mit Acetanhydrid/HCl bei 0 °C chloriert. Im statistischen Mittel enthält das Polymer dann auf 19 Styroleinheiten eine Tritylchlorid-Gruppe (4).



Ein polymeres Dimethoxytritylcarbinol vom Typ (3) konnte auch durch Copolymerisation von Styrol, Divinylbenzol und Bis-(*p*-methoxyphenyl)-*p*-vinylphenyl-methanol erhalten werden. Wir verwendeten es jedoch nicht für die hier beschriebenen Versuche.

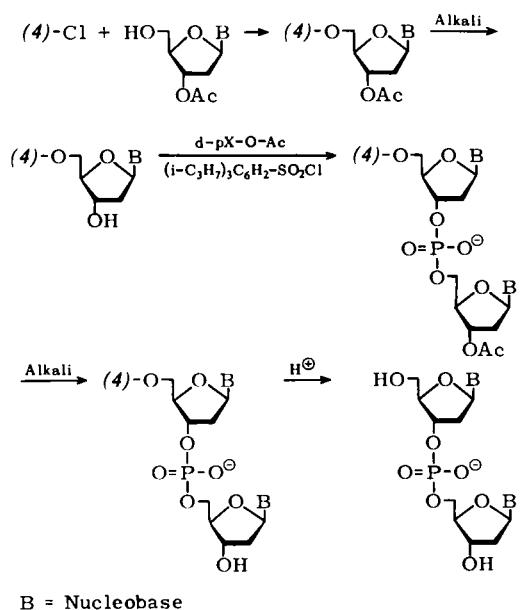
Das polymere Dimethoxytritylchlorid (4), R = OCH₃^[7], konnte zu 50–60 % mit 3'-O-Acetyldeoxythymidin (d-T-O-Ac) (0,2 mmol d-T pro g polymerem Träger) und zu 5–10 % mit d-TpT-O-Ac (0,02 mmol d-TpT pro g polymerem Träger) beladen werden (Pyridin, 48 Std., 70 °C). Die Abspaltung der Acetylgruppen gelingt mit 0,1N Tetramethylammoniumhydroxid in Isopropanol (3 Std., Raumtemperatur) oder mit einem Gemisch aus Dimethylformamid, Pyridin, 1 M Natriumäthylat (5:4:1 v/v) (1 Std., Raumtemperatur).

Die Abspaltung der synthetisierten Oligonucleotidketten vom Träger gelingt mit 80-proz. Essigsäure bei 70 °C in 1 Std. oder bei Raumtemperatur in 6 Std. oder mit einem Pyridin-Essigsäure-Puffer (Pyridin:Essigsäure:Wasser = 3:10:3 v/v) bei Raumtemperatur in 48 Std. Da Desoxyadenosin-5'-monophosphat mindestens 24 Std. in 80-proz. Essigsäure und mindestens vier Wochen im Pyridin-Acetat-Puffer stabil ist, ist damit auch die Verwendung von Purinnucleotiden möglich.

Der Träger kann auch mit vorgefertigten Oligonucleotiden beladen und dann um eine Dinucleotideinheit verlängert werden (Blockkondensation). Dieses Verfahren ermöglicht die Synthese längerer, biochemisch interessanter Ketten.

Die Knüpfung der Nucleotidbindung erfolgte mit Triisopropylbenzolsulfochlorid in Pyridin (4 Std. oder 6–8 Std. für Blockkondensation).

Nach der Kondensation wurde nicht wie üblich Wasser zugesetzt, sondern die Reaktion durch Fällung mit wasserfreiem Äther gestoppt. Durch gründliches Waschen mit Äther entfernt man überschüssiges Triisopropylbenzolsulfato-



[6] Versuche an einem mit 0,2 % Divinylbenzol vernetzten Popcorn-Polystyrol, das Mono- oder Dimethoxytritylchloridgruppen trägt, sind noch nicht abgeschlossen.

[7] Abkürzungen: d = desoxy, T = Thymidin, A = Adenosin, C = Cytidin, G = Guanosin, X = A, C, T oder G, pT = Thymidin-5'-phosphat, Tp = Thymidin-3'-phosphat, T-O-Ac = 3'-O-Acetyl-thymidin, N-Ac = acetylierte Aminogruppe der Nucleobase.

Darstellung von 2,4,6-Tri-tert.-butyl-pyrylium-tetrafluoroborat, 2,4,6-Tri-tert.-butyl-pyridin und 2,4,6-Tri-tert.-butyl-phosphorin

Von K. Dimroth und W. Mach^[*]

Pyryliumsalze mit tert.-Butylgruppen in 2,4,6-Stellung waren bisher nicht bekannt. Ein solches Salz, dessen Synthese wir hier beschreiben, ermöglichte erstmals die Darstellung des 2,4,6-Tri-tert.-butyl-pyridins und des 2,4,6-Tri-tert.-butyl-phosphorins, des ersten durch rein aliphatische Reste substituierten Phosphorin-Derivates.

2,4,6-Tri-tert.-butyl-pyrylium-tetrafluoroborat (6) erhielten wir in einer Gesamtausbeute von 42% auf dem im Formel-

	Nucleosid-komponente	Phosphat-komponente [a]	Ausbeute (%) bezogen auf Gesamtmenge an eluiertem Nucleotid-Material [b]			
			d-TpT	d-TpTpX	d-TpTpTpT	d-TpTpTpTpTpT
I	(4)-d-T	d-pT-O-Ac	49,5			
II	(4)-d-TpT	d-pT-O-Ac	33,0	67,0		
III	(4)-d-TpT	d-pT-O-Ac	32,0	34,0	34,0 [c]	
IV	(4)-d-TpT	d-pTpT-O-Ac	36,2		33,3	30,6 [c]
V	(4)-d-TpT	d-pC(N ⁶ -Ac)-O-Ac	58,7	41,3		
VI	(4)-d-TpT	d-pA(N ⁶ -Ac)-O-Ac	70,1	29,9		
VII	(4)-d-TpT	d-pG(N ² -Ac)-O-Ac	74,1	20,9		

[a] Es wurde ein 50- bis 100-facher Überschuß an Nucleotid verwendet. Im Experiment I führte ein 10-facher Überschuß zur gleichen Ausbeute.

[b] Laut IR-Spektrum verließen alle Abspaltungen mit mindestens 97 % Ausbeute.

Zu VI: λ_{max} von d-TpTpA: 262 nm (verwendet wurde $\epsilon = 33400$); zu VII: λ_{max} von d-TpTpG: 258 nm (verwendet wurde $\epsilon = 30600$).

[c] Nach zweifacher Kondensation mit der Phosphatkompone.

chlorid und eluiert die überschüssigen Nucleotide anschließend mit 20-proz. wäßrigem Pyridin. Diese Aufarbeitungsmethode spart Zeit und liefert die Nucleotide praktisch verlustfrei in einer Form zurück, die es gestattet, sie nach Entfernung des Wassers direkt für eine erneute Kondensation einzusetzen.

Auf diese Weise läßt sich bequem ein Kondensations-schritt pro Tag durchführen, so daß die Synthese von d-TpTpTpTpTpT einschließlich Beladung und Aufarbeitung nicht mehr als eine Woche in Anspruch nimmt.

Die synthetisierten Oligonucleotide können mit Schlangengift-Phosphodiesterase quantitativ abgebaut werden und liefern die geforderten Verhältnisse von d-T und d-pT bzw. d-T, d-pT und d-pX (X = A, C, G).

Eingegangen am 27. März 1968 [Z 771]

[*] Prof. Dr. F. Cramer und Dipl.-Chem. H. Köster
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin,
Abteilung Chemie
34 Göttingen, Hermann-Rein-Straße 3

[1] 2. Mitteilung. – 1. Mitteilung: F. Cramer, R. Helbig, H. Hettler, K.-H. Scheit u. H. Seliger, Angew. Chem. 78, 640 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 601 (1966).

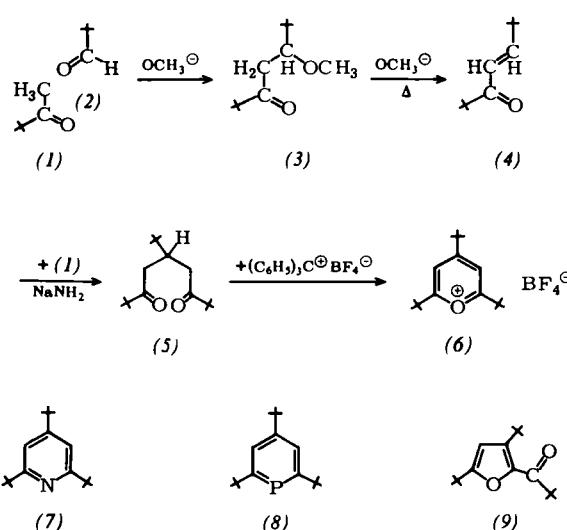
[2] H. Hayatsu u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 89, 3880 (1967).

[3] L. R. Melby u. D. R. Strobach, J. Amer. chem. Soc. 89, 450 (1967).

[4] R. L. Letsinger, M. H. Caruthers u. D. M. Jerina, Biochem. 6, 1379 (1967).

[5] F. Cramer, Angew. Chem. 78, 186 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 173 (1966).

schemata angegebenen Weg. (3) geht beim Kochen im basischen Milieu weitgehend in das ungesättigte Keton (4) über, während es sich mit Säuren in ein cyclisches Carboxonium-salz umlagert^[11].



2,4,6-Tri-tert.-butyl-pyridin (7), $F_p = 69^\circ\text{C}$, bildet sich quantitativ aus (6) mit alkoholischem Ammoniak. NMR: Singulets $\delta = -7,02$ ppm (2 H), $\delta = -1,34$ ppm (18 H) und $\delta = -1,30$ ppm (9 H). (7) kann aus Äthanol/Wasser umkristallisiert werden.