

Wolfgang Freist und Friedrich Cramer

Synthese von Oligodesoxynucleotiden mit 2-[α -Pyridyl]-äthanol als Phosphatschutzgruppe

Aus dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen

(Eingegangen am 15. Mai 1970)

Durch die Synthese von Di- und Tridesoxynucleotiden (**3**, **5**) wird gezeigt, daß 2-[α -Pyridyl]-äthanol als Phosphatschutzgruppe bei der Oligodesoxynucleotidsynthese verwendet werden kann. Die Abspaltung der Phosphatschutzgruppe mit Natriummethylat in Pyridin aus den voll geschützten Di- und Tridesoxynucleotiden liefert *N*-geschützte Oligodesoxynucleotide.

Synthesis of Oligodeoxynucleotides with 2-(α -Pyridyl)ethanol as Phosphate Protecting Group

The synthesis of di- and trideoxynucleotides (**3**, **5**) shows that 2-(α -pyridyl)ethanol can be used as phosphate protecting group in oligodeoxynucleotide synthesis. Cleavage of the phosphate protecting group by sodium methylate in pyridine from the fully protected di- and trideoxynucleotides yields *N*-protected oligonucleotides.

Phosphatschutzgruppen, die für die Synthese von Oligodesoxynucleotiden verwendet werden, sollen die selektive Abspaltung der Schutzgruppen am 3'-Ende der voll geschützten Nucleotide gestatten. Bisher sind dafür drei Schutzgruppen, die diese Bedingung erfüllen, mit Erfolg eingesetzt worden: die reduktiv mit Zinkstaub abspaltbare β,β,β -Trichlor-äthyl-Gruppe¹⁾, das durch Perjodat-Oxydation und anschließende β -Eliminierung entfernbare 2',3'-*O*-[2,4-Dimethoxy-benzyliden]-uridin²⁾ und *S*-Äthyl-thiophosphat³⁾, das mit Jod in das Phosphat übergeführt wird.

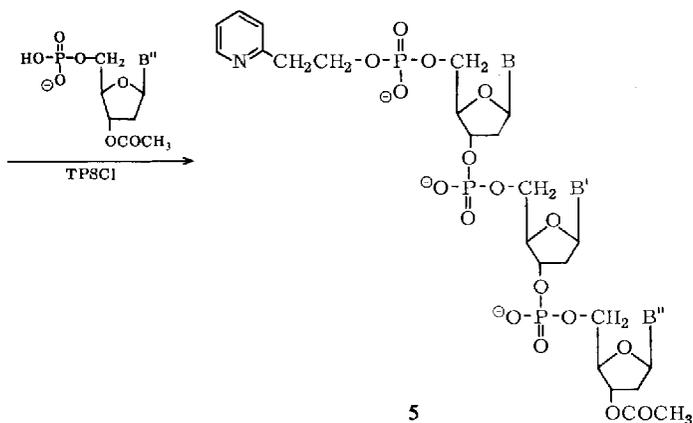
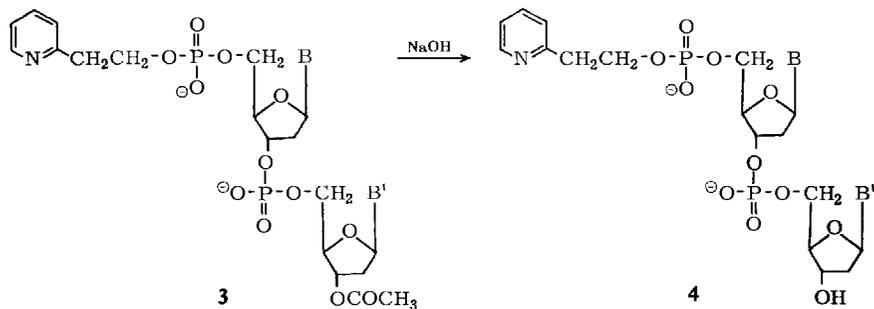
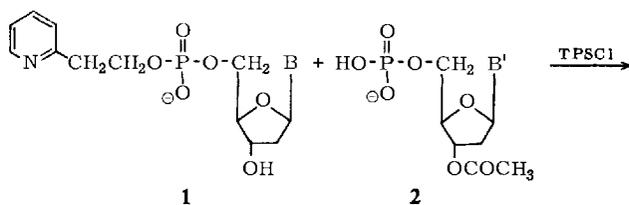
Nach unseren Untersuchungen sind 2-[α -Pyridyl]-äthylester von Desoxynucleosid-5'-phosphorsäuren gegen *2n* Alkali stabil und werden nur durch Alkoholat gespalten⁴⁾; alkalilabile 3'-*O*-Acetylgruppen können so aus 3'-*O*- und *N*-geschützten Desoxynucleosid-5'-phosphorsäure-[2-(α -pyridyl)-äthylestern] selektiv abgespalten werden⁴⁾. Da unter den Bedingungen für die Abspaltung der 2-[α -Pyridyl]-äthyl-Gruppe die *N*-Schutzgruppen weitgehend stabil sind⁴⁾, sollte diese Schutzgruppe besonders vorteilhaft für die direkte Synthese *N*-geschützter Oligodesoxynucleotide sein. Wir haben die Eignung der 2-[α -Pyridyl]-äthyl-Gruppe für die Oligodesoxynucleotidsynthese durch die Darstellung einiger Di- und Tridesoxynucleotide geprüft und die Bedingungen für die Abspaltung dieser Phosphatschutzgruppe untersucht.

1) F. Eckstein, Chem. Ber. **100**, 2228, 2236 (1967).

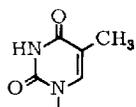
2) F. Kathawala und F. Cramer, Liebigs Ann. Chem. **709**, 185 (1967); **712**, 195 (1968).

3) A. F. Cook, M. J. Holman und A. L. Nussbaum, J. Amer. chem. Soc. **91**, 1522, 6479 (1969).

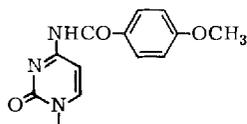
4) W. Freist, R. Helbig und F. Cramer, Chem. Ber. **103**, 1032 (1970).



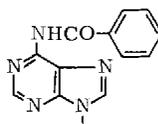
B, B' bzw. B'':



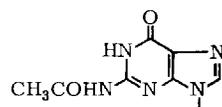
Thymyl



N⁴-[4-Methoxybenzoyl]-cytosyl



N⁶-Benzoyl-adenyl



N²-Acetyl-guanyl

TPSCl = 2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid

Zur Darstellung der Didesoxynucleotide wurden phosphat- und gegebenenfalls auch *N*-geschützte Monodesoxynucleotide (**1**) und 3'-*O*- bzw. auch *N*-geschützte Desoxynucleosid-5'-phosphorsäure (**2**) mit 2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid (TPSCI) kondensiert. Bei doppeltem Überschuß an Phosphatkomponente lagen die Ausbeuten an Didesoxynucleotid (**3**) zwischen 30 und 60% (Tab. 1).

Tab. 1. Ausbeuten bei der Synthese von Di- und Tridesoxynucleotiden*)

Didesoxynucleotid	Ausb.	Tridesoxynucleotid	Ausb.
(Pyet)pdTpdt(Ac)	(3aa) 57%	(Pyet)pdTpdtPd(Ac)	(5aaa) 38%
(Pyet)pdTpdbz ⁶ A(Ac)	(3ae) 44%	(Pyet)pdTpdpdbz ⁶ A(Ac)	(5aac) 17%
(Pyet)pdTpdac ² G(Ac)	(3ad) 33%	(Pyet)pdTpdpdac ² G(Ac)	(5aad) 13%
(Pyet)pdbz ⁶ ApdT(Ac)	(3ea) 42%	(Pyet)pdTpdp(4-CH ₃ O)bz ⁶ C(Ac)	(5aab) 23%
(Pyet)pd(4-CH ₃ O)bz ⁶ CpdT(Ac)	(3ba) 38%		

*) Nomenklatur nach IUPAC-IUB-Empfehlungen.

Die 2-[α -Pyridyl]-äthyl-Gruppen wurden aus den voll geschützten Didesoxynucleotiden unter ähnlich milden Bedingungen wie bei Monodesoxynucleotiden⁴⁾ mit 2*n* NaOCH₃ in Methanol/Pyridin (1:1) abgespalten, jedoch war eine etwas längere Reaktionszeit erforderlich. Während die 3'-*O*-Acetylgruppen dabei mitabgespalten werden, bleiben die gegen starkes Alkali stabileren *N*-Schutzgruppen⁵⁾ weitgehend erhalten (Tab. 2). Der Anteil an Nebenprodukt ohne *N*-Schutzgruppen liegt jedoch etwas höher als beim Monodesoxynucleotid.

Tab. 2. Behandlung der voll geschützten Didesoxynucleotide mit NaOCH₃

voll geschütztes Didesoxynucleotid	<i>N</i> -geschütztes Didesoxynucleotid	Ausb.	ungeschütztes Didesoxynucleotid	Ausb.
(Pyet)pdTpdt(Ac)	(3aa)		pdTpdt	83%
(Pyet)pdTpdbz ⁶ A(Ac)	(3ae)	pdTpdbz ⁶ A	pdTpdtA	9%
(Pyet)pdTpdac ² G(Ac)	(3ad)	pdTpdac ² G	pdTpdtG	19%
(Pyet)pdbz ⁶ ApdT(Ac)	(3ea)	pdbz ⁶ ApdT	pdApdT	10%
(Pyet)pd(4-CH ₃ O)bz ⁶ CpdT(Ac)	(3ba)	pd(4-CH ₃ O)bz ⁶ CpdT	pdCpdT	62%

Im Falle des Didesoxynucleotids **3ba** lieferte eine Abspaltung mit Kalium-tert.-butylat anstelle von Natriummethylat ebenfalls mehr Didesoxynucleotid mit *N*-Schutzgruppe als ungeschütztes Didesoxynucleotid (46%:17%).

Zur Synthese von Tridesoxynucleotiden wurde zunächst mit 2*n* NaOH die 3'-*O*-Acetylgruppe des 5'-*O*-{Hydroxy-[2-(α -pyridyl)-äthoxy]-phosphoryl}-thymidyl- (3'→5')-3'-*O*-acetyl-thymidins (**3aa**) abgespalten. Das Reaktionsprodukt **4** wurde mit den verschiedenen geschützten Mononucleotiden (**2**) zu den entsprechenden Tridesoxynucleotiden (**5**) wie bei der Didesoxynucleotidsynthese kondensiert; die Ausbeuten lagen zwischen 10 und 40% (Tab. 1).

Die 2-[α -Pyridyl]-äthyl-Gruppe wurde bei den voll geschützten Tridesoxynucleotiden mit NaOCH₃ in Methanol/Pyridin nur nach langen Reaktionszeiten mit schlechten Ausbeuten abgespalten. Wesentlich besser gelang die Reaktion in Methanol/Pyridin/Dimethylformamid (1:1:1). Auch hier sind die *N*-Schutzgruppen weitgehend stabil, das ungeschützte Tridesoxynucleotid tritt wieder als Nebenprodukt auf (Tab. 3).

5) Vgl. R. K. Ralph und H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. **83**, 2926 (1961).

Tab. 3. Behandlung der voll geschützten Tridesoxynucleotide mit NaOCH₃

voll geschütztes Tridesoxynucleotid		N-geschütztes Tridesoxynucleotid	Ausb.	ungeschütztes Tridesoxynucleotid	Ausb.
(Pyet)pdTpdTpdT(Ac)	(5aaa)			pdTpdTpdT	60%
(Pyet)pdTpdTpdTbz ⁶ A(Ac)	(5aac)	pdTpdTpdTbz ⁶ A	56%	pdTpdTpdA	11%
(Pyet)pdTpdTpdTdac ² G(Ac)	(5aad)	pdTpdTpdTdac ² G	63%		
(Pyet)pdTpdTpdT(4-CH ₃ O)bz ⁴ C(Ac)	(5aab)	pdTpdTpdT(4-CH ₃ O)bz ⁴ C	30%	pdTpdTpdC	10%

Nach Abspaltung der 2-[α -Pyridyl]-äthyl- und 3'-O-Acetyl-Gruppen wurden bei den N-geschützten Di- und Tridesoxynucleotiden die N-Schutzgruppen mit Ammoniak abgespalten. Die ungeschützten Di- und Tridesoxynucleotide lieferten beim Abbau mit Schlangengift-Phosphodiesterase die entsprechenden 5'-Monodesoxynucleotide in den berechneten Verhältnissen (Tab. 4).

Tab. 4. Abbau der Di- und Tridesoxynucleotide mit Schlangengift-Phosphodiesterase

Substanz	Zusammensetzung	Ber.	Gef.
pdTpdT	2 pdT		2 pdT
pdTpdA	pdT : pdA	1 : 1	1 : 1.05
pdTpdG	pdT : pdG	1 : 1	1 : 0.90
pdApdT	pdA : pdT	1 : 1	1 : 1.08
pdCpdT	pdC : pdT	1 : 1	1 : 0.91
pdTpdTpdT	3 pdT		3 pdT
pdTpdTpdA	pdT : pdA	2 : 1	1.78 : 1
pdTpdTpdG	pdT : pdG	2 : 1	1.90 : 1
pdTpdTpdC	pdT : pdC	2 : 1	1.92 : 1

Die 2-[α -Pyridyl]-äthyl-Schutzgruppe eignet sich nach unseren Ergebnissen zur schrittweisen Synthese von Oligodesoxynucleotiden mit einer 5'-Phosphatgruppe. Die Stabilität der N-Schutzgruppen bei der Abspaltung dieser Phosphatschutzgruppe läßt ihre Anwendung besonders dann zweckmäßig erscheinen, wenn N-geschützte Oligodesoxynucleotide dargestellt werden sollen.

Wir danken Frau E. Kassner für geschickte Mitarbeit.

Beschreibung der Versuche

Pyridin wurde mit Calciumhydrid getrocknet.

Für die spektrophotometrischen Messungen wurde das Zeiss-Spektralphotometer RPQ 20 benutzt.

Die Papierchromatogramme (Papier Schleicher & Schüll 2043 b, gewaschen) wurden absteigend entwickelt mit den Laufmittelsystemen A = Äthanol/1 m Ammoniumacetat (5 : 2, v/v) und B = n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (55 : 10 : 35, v/v).

Für die Elektrophorese wurden die Papiersorten Whatman 3 MM und Schleicher & Schüll 2043 b, gewaschen, sowie Phosphatpuffer pH 7 verwendet.

Der Abbau der Oligonucleotide wurde mit Schlangengift-Phosphodiesterase von C. F. Boehringer, Mannheim, durchgeführt.

Beispiel für die Darstellung eines Didesoxynucleotids:

5'-O-{Hydroxy-[2-(α -pyridyl)-äthoxy]-phosphoryl}-thymidyl-(3' \rightarrow 5')-3'-O-acetyl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin (3ae): 1220 Optical-Density-Einheiten (OD) = 0.102 mMol Thymidin-

5'-phosphorsäure-[2-(α -pyridyl)-äthylester] (**1a**) wurden mit 3750 OD = 0.204 mMol 3'-O-Acetyl-N⁶-benzoyl-desoxyadenosin-5'-phosphorsäure (Pyridiniumsalz) (**2c**) durch dreimaliges Eindampfen mit absol. Pyridin wasserfrei gemacht. Nach Aufnehmen in 5 ccm absol. Pyridin wurden 247 mg = 0.816 mMol 2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid zugegeben. Nach 15 Stdn. wurden unter Eiskühlung etwa 5 ccm Wasser zugesetzt und nach mehrstdg. Stehenlassen zur Trockne eingedampft. Bei der papierchromatographischen Trennung wurden die Zonen mit dem R_F -Wert 0.64 ausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Das Eluat wurde eingedampft und das Dinucleotid durch mehrmaliges Aufnehmen mit absol. Pyridin von dem beigegebenen Salz des Laufmittels getrennt. Ausb. 1080 OD = 0.0448 mMol (44%).

Tab. 5. Daten der voll geschützten Di- und Tridesoxynucleotide

		λ_{\max} [m μ]	$\epsilon^{*)}$	R_F -Wert System A	Beweglich- keit **) bei pH 7
(Pyet)pdTpdT(Ac)	(3aa)	262	21370	0.57	0.72
(Pyet)pdTpdbz ⁶ A(Ac)	(3ac)	266	24050	0.64	0.64
(Pyet)pdTpdac ² G(Ac)	(3ad)	258	27910	0.56	0.67
(Pyet)pdbz ⁶ ApdT(Ac)	(3ca)	266	24050	0.65	0.65
(Pyet)pd(4-CH ₃ O)bz ⁴ CpdT(Ac)	(3ba)	263	29130	0.56	0.56
(Pyet)pdTpdTpdT(Ac)	(5aaa)	263	31030	0.38	0.88
(Pyet)pdTpdTpdTpdbz ⁶ A(Ac)	(5aac)	266	33650	0.48	0.77
(Pyet)pdTpdTpdac ² G(Ac)	(5aad)	259	37210	0.36	0.77
(Pyet)pdTpdTpd(4-CH ₃ O)bz ⁴ C(Ac)	(5aab)	264	35620	0.47	0.64

***)** Die ϵ -Werte sind aus den UV-Kurven der Monodesoxynucleotide berechnet, sie liegen den spektrophotometrischen Bestimmungen zugrunde.

****)** Bezogen auf pdT.

Abspaltung der 2-[α -Pyridyl]-äthyl-Gruppe bei Didesoxynucleotiden: 100–300 OD der voll geschützten Didesoxynucleotide (**3**) wurden durch dreimaliges Versetzen mit absol. Pyridin und Eindampfen zur Trockne wasserfrei gemacht und in 1 ccm absol. Pyridin aufgenommen. Dann wurde 1 ccm 4*n* methanolische Natriummethylat-Lösung (bei Abspaltungen mit Kalium-*tert.*-butylat 1 ccm 1*n* Lösung in absol. *t*-BuOH) hinzugegeben und 72 Stdn. bei 0° stengelassen. Darauf wurde mit der Pyridiniumform von Ionenaustauscher Dowex Typ 50 WX 4 neutralisiert, der Ionenaustauscher abfiltriert und das Filtrat i. Vak. eingedampft. Das Reaktionsgemisch wurde papierchromatographisch (System A) aufgetrennt (R_F -Werte Tab. 6) und die Ausb. spektrophotometrisch bestimmt.

Tab. 6. R_F -Werte der *N*-geschützten und ungeschützten Di- und Tridesoxynucleotide

<i>N</i> -geschütztes Di- bzw. Tridesoxy- nucleotid	R_F -Wert System A	ungeschütztes Di- bzw. Tri- desoxynucleotid	R_F -Wert System A	R_F -Wert System B
		pdTpdT	0.12	
pdTpdbz ⁶ A	0.26	pdTpdA	0.10	
pdTpdac ² G	0.17	pdTpdG	0.09	
pdbz ⁶ ApdT	0.26	pdApdT	0.10	
pd(4-CH ₃ O)bz ⁴ CpdT	0.23	pdCpdT	0.10	
		pdTpdTpdT	0.08	0.29
pdTpdTpdbz ⁶ A	0.15	pdTpdTpdA	0.06	0.25
pdTpdTpdac ² G	0.07			
pdTpdTpd(4-CH ₃ O)bz ⁴ C	0.10	pdTpdTpdC	0.04	0.26

Darstellung der Trinucleotide: 4280 OD = 0.201 mMol 5'-O-{Hydroxy-[2-(α -pyridyl)-äthoxy]-phosphoryl}-thymidyl-(3'→5')-3'-O-acetyl-thymidin (**3aa**) wurden mit 4 ccm Pyridin/2*n* NaOH (1:1) 1 Stde. geschüttelt. Dann wurde mit der Pyridiniumform von Ionenaustauscher Dowex 50 WX 4 neutralisiert und das Produkt papierchromatographisch im System B

gereinigt (R_F -Wert 0.59). Ausb. 3720 OD = 0.174 mMol (87%). Nach Überführung in das *Pyridiniumsalz* mit der Pyridiniumform von Dowex 50 WX 4 wurden jeweils 900 OD wie bei der Didesoxynucleotidsynthese mit den 3'-*O*- bzw. auch *N*-geschützten 5'-*Monodesoxynucleotiden* (2) zum *Tridesoxynucleotid* kondensiert. Die Isolierung des Reaktionsproduktes erfolgte ebenfalls analog zur Didesoxynucleotidsynthese.

Abspaltung der 2-[α -Pyridyl]-äthyl-Gruppe bei Tridesoxynucleotiden: 100–200 OD der voll geschützten *Tridesoxynucleotide* (5) wurden durch dreimaliges Versetzen mit absol. Pyridin und Eindampfen zur Trockne wasserfrei gemacht und in einem Gemisch von 0.5 ccm absol. Pyridin und 0.5 ccm absol. DMF aufgenommen. Dann wurde mit 0.5 ccm 4*n* methanolischer *Natriummethylat*-Lösung 6–7 Tage bei 0° stengelassen, die Lösung anschließend mit der Pyridiniumform von Dowex 50 WX 4 neutralisiert, der Austausch abfiltriert und das Filtrat i. Vak. eingedampft. Nach papierchromatographischer Trennung im System A (vgl. Tab. 5) wurde die Ausb. spektrophotometrisch bestimmt (Tab. 3).

Abbau der Di- und Tridesoxynucleotide mit Schlangengift-Phosphodiesterase: Nach Abspaltung der Phosphat- und *O*-Schutzgruppen mit *Natriummethylat* und Abspaltung der *N*-Schutzgruppen mit konz. *Ammoniak* (48 Stdn. bei Raumtemp.) wurden etwa 10 OD der ungeschützten *Di-* bzw. *Tridesoxynucleotide* in 0.1 ccm Trispuffer (pH 8.6) gelöst und mit 0.01 ccm Lösung von *Phosphodiesterase* in Glycerin (1 mg/1 ccm) bei 37° 15 Stdn. inkubiert. Danach wurde auf Papier aufgetragen und nach dem Entwickeln im System A und Elution der Flecke mit bidest. Wasser die Menge der *Mononucleotide* spektrophotometrisch bestimmt (Tab. 4).

[174/70]