

Chemische Synthese von Desoxyoligonucleotiden mit 5'-Phosphatgruppe am polymeren Träger

Hans Sommer^{*)} und Friedrich Cramer^{*}

Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin^{*}, Abteilung Chemie,
D-3400 Göttingen, Hermann-Rein-Straße 3

Eingegangen am 1. August 1973

Zwei neue Methoden zur Verknüpfung von Nucleotiden über die 5'-Phosphatgruppe mit einem polymeren Träger werden beschrieben: Im einen Falle dient ein Ribocytidin als Zwischenglied und erfolgt die Wiederabspaltung durch Hydrolyse mit Trifluoressigsäure, Perjodat-Oxidation und β -Eliminierung, im zweiten Falle wird ein Nucleosid-5'-phosphorothioat mit einem Chlormethylpolystyrol unter *S*-Alkylierung umgesetzt, und die Abspaltung gelingt unter milden Bedingungen mit Jod/Wasser.

Die Brauchbarkeit beider Konzepte für die Darstellung von Oligonucleotiden mit 5'-Phosphatgruppe wurde durch die Synthese der Oligonucleotide (pdT)₅, pdTpdApdT, pdTpdCpdT und pdTpdGpdT demonstriert.

Chemical Synthesis of Deoxyoligonucleotides with 5'-Phosphate Group on a Polymer Support

Two new methods are described for attaching nucleotides *via* the 5'-phosphate group to a polymer support: The first procedure uses a ribocytidine as connecting link; cleavage is carried out by hydrolysis with trifluoroacetic acid, periodate oxidation and β -elimination. The principle of the second method is the reaction of chloromethyl polystyrene with a nucleoside-5'-phosphorothioate leading to a *S*-alkyl-5'-phosphorothioate; cleavage occurs under mild conditions with iodine/water.

Both concepts were successfully used for synthesizing of the 5'-phosphate containing oligonucleotides (pdT)₅, pdTpdApdT, pdTpdCpdT, and pdTpdGpdT.

Zur Darstellung von Oligonucleotiden^{**}) ist die Synthese am polymeren Träger (Merrifield-Methode) vorteilhaft verwendbar, da sie im Vergleich zur konventionellen Methode in Lösung relativ gute Ausbeuten unter Zeit- und Arbeitersparnis erbringt. Diese Oligonucleotide können anschließend zu längeren Nucleinsäureketten zusammengesetzt werden (Blockkondensation^{1, 2)}).

^{*)} Z. Zt. University of California, San Francisco Medical Center, School of Medicine, Dept. of Biochemistry, San Francisco, California 94122, USA.

^{**}) Abkürzungen der Oligonucleotide nach IUPAC-IUB Literature Recommendations, Eur. J. Biochem. **15**, 203 (1970):

dA = Desoxyadenosin, dG = Desoxyguanosin, dC = Desoxycytidin, dT = Thymidin; dbz⁶A = N⁶-Benzoyl-dA, dac²G = N²-Acetyl-dG, dan⁴C = N⁴-Anisoyl-dC; dA(Ac) = 3'-O-Acetyl-dA; pdA = dA-5'-phosphat, dAp = dA-3'-phosphat; pdbz⁶A(Ac) = N⁶-Benzoyl-3'-O-acetyl-dA-5'-phosphat.

1) A. Kumar und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. **91**, 2743 (1969); J. Hachmann und H. G. Khorana, ebenda **91**, 2749 (1969).

2) S. A. Narang und S. K. Dheer, Biochemistry **8**, 3443 (1969).

Bei der Mehrheit der bisher beschriebenen Methoden³⁻⁸⁾ wird im ersten Schritt ein Nucleosid an einem polymeren Träger befestigt, so daß man am Ende der Synthese und nach Abspaltung vom Träger Oligonucleotide mit freier 5'-OH-Gruppe erhält. Bei weiteren Arbeiten wurde im ersten Schritt ein Nucleotid über seine 5'-Phosphatgruppe mit primären Amino- bzw. Hydroxygruppen des Trägers umgesetzt⁹⁻¹¹⁾.

In dieser Arbeit werden zwei neue Möglichkeiten¹²⁾ beschrieben, geschützte Desoxyoligonucleotide mit 5'-Phosphatgruppe zu synthetisieren, welche direkt in Blockkondensationen eingesetzt werden können. Die Abspaltung der geschützten Oligonucleotide vom Träger erfolgt wesentlich milder als bisher⁹⁻¹¹⁾ beschrieben, so daß keine Gefahr der Spaltung der *N*-glycosidischen Bindung von *N*⁶-Benzoyldeoxyadenosin und der ungewollten Abspaltung von Schutzgruppen besteht¹²⁾.

Ergebnisse

Als polymerer Träger wurde ein mit 5% Divinylbenzol vernetztes makroporöses Polystyrol^{4,13)} verwendet, das in unpolaren organischen Lösungsmitteln gut quellbar ist, dagegen in polaren Lösungsmitteln – wie Wasser oder Methanol – nicht quillt. In dieses Polymere wurden nach beschriebenen Methoden *p,p'*-Dimethoxytritylchlorid-Gruppen als funktionelle Gruppen eingeführt^{3,4)}. Als Bindeglied, das am Ende der Synthese die Abspaltung des Produkts erlaubt, wurde zwischen die Dimethoxytritylgruppe und das erste Desoxynucleotid der aufzubauenden Desoxyoligonucleotidkette geschütztes Ribocytidin eingeführt. Die freie 5'-OH-Gruppe von 2',3'-(2,4-Dimethoxybenzyliden)-cytidin (**1**)¹⁴⁾ wurde mit der Pseudosaccharyl-Gruppe¹⁵⁾ geschützt (**2**), und **2** mit der Dimethoxytrityl-Gruppe des Polymeren umgesetzt (**3**). Danach wurde die Pseudosaccharyl-Schutzgruppe ammonolytisch entfernt (**4**). Mit der Veresterung der freien 5'-OH-Gruppe von **4** mit 3'-*O*-Acetyl-thymidin-5'-phosphat [pdT(Ac)] in Gegenwart von 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS-Cl) als Kondensationsmittel begann der Aufbau der Nucleotidkette (**5**). Nach der Abspaltung der 3'-*O*-Acetylgruppe mit Tetraäthylammoniumhydroxid/Pyridin (**6**) wurde der nächste Kondensationsschritt durchgeführt (**7**).

3) H. Hayatsu und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. **88**, 3182 (1966).

4) F. Cramer, R. Helbig, H. Hettler, K. H. Scheit und H. Seliger, Angew. Chem. **78**, 640 (1966); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **5**, 601 (1966); F. Cramer und H. Köster, Angew. Chem. **80**, 488 (1968); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **7**, 473 (1968); H. Köster und F. Cramer, Liebigs Ann. Chem. **766**, 6 (1972).

5) L. R. Melby und D. R. Strobach, J. Org. Chem. **34**, 421 (1969).

6) R. L. Letsinger und V. Mahadevan, J. Amer. Chem. Soc. **88**, 5319 (1966).

7) K. F. Yip und K. C. Tsou, J. Amer. Chem. Soc. **93**, 3272 (1971).

8) T. Kusama und H. Hayatsu, Chem. Pharm. Bull. **18**, 319 (1970).

9) E. Ohisuka, S. Morioka und M. Ikehara, J. Amer. Chem. Soc. **94**, 3229 (1972).

10) G. M. Blackburn, M. J. Brown und M. R. Harris, J. Chem. Soc. C **1967**, 2438.

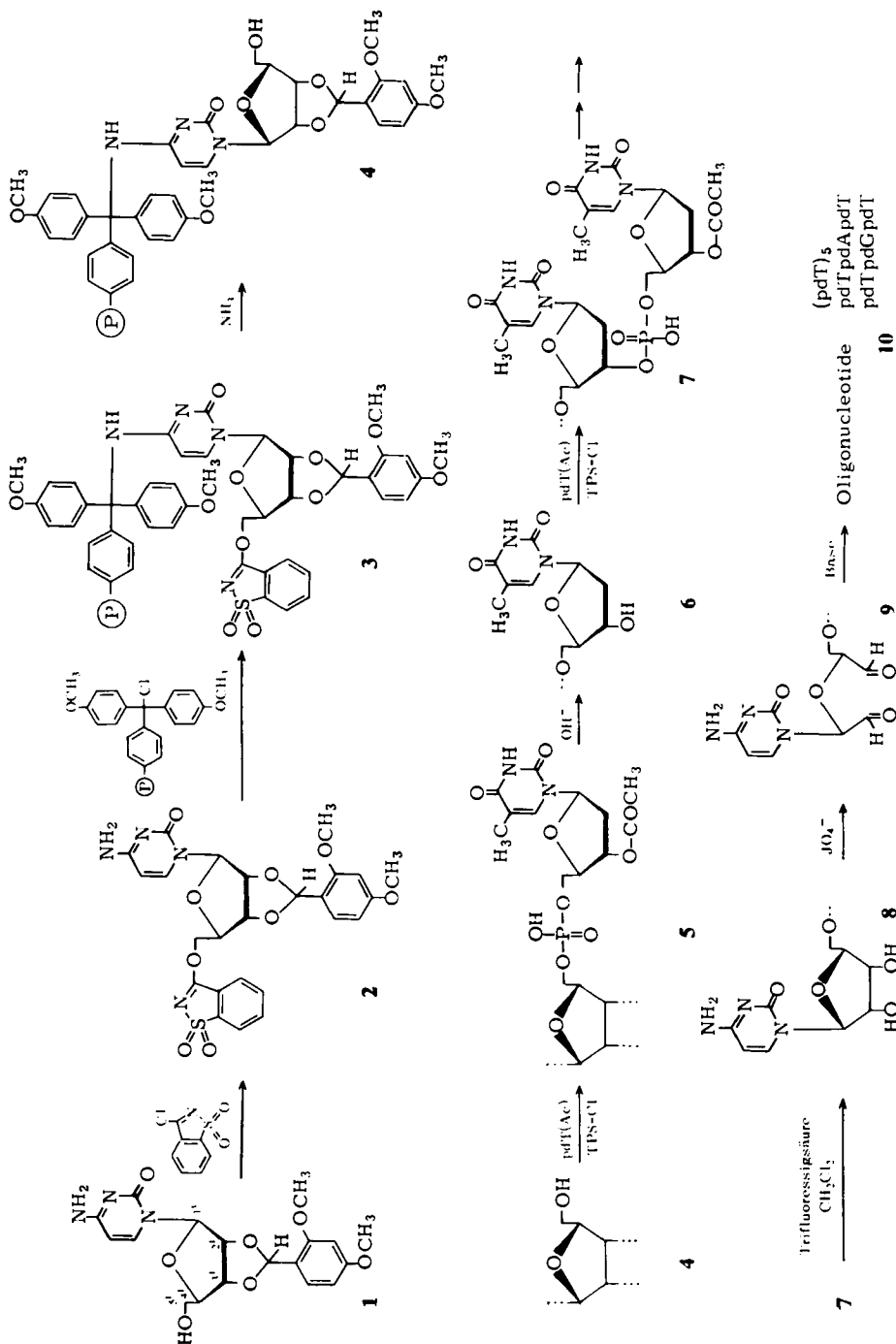
11) W. Freist und F. Cramer, Angew. Chem. **82**, 358 (1970); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **9**, 368 (1970).

12) Vorläufige Mitteilung: H. Sommer und F. Cramer, Angew. Chem. **84**, 710 (1972); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **11**, 717 (1972).

13) R. Helbig et al., unveröffentlicht.

14) F. Cramer, W. Saenger, K. H. Scheit und J. Tennigkeit, Liebigs Ann. Chem. **679**, 156 (1964).

15) H. Hettler, Z. Anai. Chem. **220**, 9 (1966).

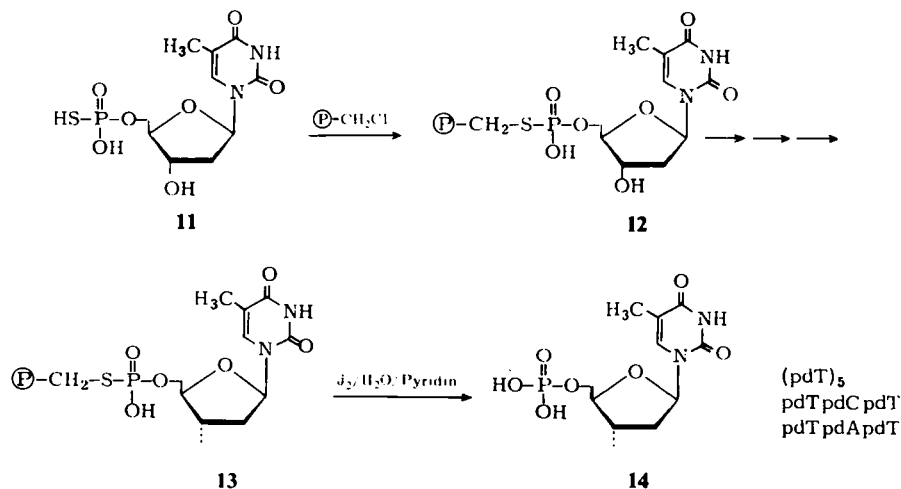


Die Abspaltung der Desoxyoligonucleotidkette vom Polymeren erfolgte mit Trifluoressigsäure/ CH_2Cl_2 , wobei gleichzeitig die Dimethoxybenzyliden-Gruppe am Ribocytidin entfernt wurde (7 \rightarrow 8). Eine anschließende Perjodatspaltung¹⁶⁾ der *cis*-Diolgruppierung des Ribocytidin-Restes und nachfolgende β -Eliminierung des Dialdehydes 9 mit Ammoniak lieferte die Desoxyoligonucleotide mit freier 5'-Phosphatgruppe. Dabei werden gleichzeitig die *N*-Schutzgruppen der Basen abgespalten; wenn dies vermieden werden soll, kann für die β -Eliminierung statt Ammoniak ein Anilinacetat-Puffer¹⁷⁾ verwendet werden.

Die Synthese verschiedener Oligothymidylsäuren, $(\text{pdT})_2$, $(\text{pdT})_3$, $(\text{pdT})_4$, $(\text{pdT})_5$ und „gemischter“ Desoxyoligonucleotide mit Desoxyadenosin und Desoxyguanosin – pdTpdApdT über pdTpdA und pdTpdGpdT über pdTpdG – gelang an diesem Polymeren. Als geschützte Nucleotide wurden noch 3'-*O*-Acetyl-*N*⁶-benzoyl-desoxyadenosin-5'-phosphat [$\text{pdbz}^6\text{A}(\text{Ac})$] und 3'-*O*-,*N*²-Diacetyl-desoxyguanosin-5'-phosphat [$\text{pdac}^2\text{G}(\text{Ac})$] eingesetzt, die nach beschriebenen Verfahren^{18,19)} dargestellt waren.

Die analytische Charakterisierung der Oligonucleotide erfolgte durch Papierchromatographie und enzymatische Spaltung mit Phosphodiesterase aus Schlangengift zu 5'-Nucleotiden. Quantitative Spaltbarkeit beweist die 3',5'-Verknüpfung der Bausteine; das Verhältnis der entstehenden Mononucleotide gibt die Zusammensetzung der gespaltenen Kette wieder (s. exp. Teil).

Eine einfachere Möglichkeit, eine Desoxyoligonucleotidkette über die 5'-Phosphatgruppe an einem Polymeren zu befestigen, bietet ein chlormethyliertes, mit 5% Divinylbenzol vernetztes Polystyrol²⁰⁾. Alkylhalogenide reagieren mit Thiophosphaten²¹⁾



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

17) H. C. Neu und L. A. Heppel, J. Biol. Chem. **239**, 2927 (1964).

18) H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. **85**, 3821 (1963).

19) S. A. Narang, T. M. Jacob und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 2988 (1965).

20) R. B. Merrifield, Biochemistry **3**, 1385 (1964).

21) S. Åkerfeldt, Acta Chem. Scand. **16**, 1897 (1962).

wie Thymidin-5'-phosphorothioat²²⁾ bei 50–60°C in Dimethylformamid unter S-Alkylierung²³⁾ (11 → 12); O-Alkylierung wurde nicht beobachtet. Die Kettenverlängerung erfolgte wie oben (12 → 13).

Die Abspaltung vom Polymeren gelang mit Jod²²⁾ in Pyridin/Wasser, wobei die P–S-Bindung gelöst wird und eine normale Phosphatgruppe am Oligonucleotid entsteht (14). Der Mechanismus dieser Reaktion ist noch nicht eindeutig geklärt²⁴⁾.

Mit Hilfe dieser Verankerung wurden die Oligothymidylsäuren bis (pdT)₅ und die Oligonucleotide pdTpdCpdT über pdTpdC und die Vorstufe 3'-O-Acetyl-N⁴-anisoyl-desoxycytidin-5'-phosphat [pdan⁴C(Ac)]^{18,19)} sowie pdTpdApdT über pdTpdA dargestellt.

Diskussion

Beide hier beschriebenen Methoden gestatten die polymer-gebundene Synthese von geschützten Desoxyoligonucleotiden mit 5'-Phosphatgruppen und beliebigen Nucleotid-Sequenzen. Die Abspaltung der über Ribocytidin verankerten Oligonucleotide vom Polymeren wird mit Trifluoressigsäure eingeleitet, wobei in geringem Maße Eliminierung der N-geschützten Purinbasen N⁶-Benzoyl-adenin und N²-Acetylguanin beobachtet wurde, die sich durch die extreme Säureempfindlichkeit der N-glycosidischen Bindung erklärt. Die nachfolgende Perjodatspaltung und β'-Eliminierung zum freien Oligonucleotid wirft keine Probleme auf.

Die zweite Methode, bei der die Oligonucleotidkette über eine 5'-Thiophosphatgruppe an ein Chlormethyl-Polymeres gebunden wird, ist einfacher, erfordert aber zunächst die Synthese eines Nucleosid-5'-phosphorothioates. Diese ist selbst in größerem Maßstab kein Problem. Vorteilhaft sind die milden Abspaltbedingungen mit Jod/H₂O, die die Purinbasen nicht angreifen; eine eventuell zu befürchtende Jodierung der Nucleobasen war nicht zu beobachten.

Experimenteller Teil

Papierchromatographie erfolgte absteigend auf dem Papier 2043b (gewaschen, Schleicher & Schüll, Dassel, BRD) in: A = Äthanol/1 M Ammoniumacetat (5:2, v/v) pH 7, B = Isopropylalkohol/konz. NH₃/Wasser (7:1:2, v/v), C = n-Propanol/konz. NH₃/Wasser (55:10:35, v/v), D = Äthanol/1 M Ammoniumacetat (7:3, v/v) pH 7.5 und E = Chloroform/Methanol (9:1, v/v). Für Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten Kieselgel F 254 (Schichtdicke 0.25 mm) und PSC-Fertigplatten F 254 (Schichtdicke 2 mm, für präparative Zwecke, Merck, Darmstadt, BRD) verwendet. IR-Spektren wurden von KBr-Preßlingen im Perkin-Elmer „Infracord“ gemessen. UV-Spektren wurden im Cary 14 oder Unicam SP 1800 aufgenommen. Gehaltsbestimmungen erfolgten in A_{xxxnm}-Einheiten (Absorption von 1 ml Lösung bei der Schichtdicke 1 cm) im Zeiss PMQ II-Spektralphotometer. Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium J. Beller, Göttingen, durchgeführt. Pyridin wurde getrocknet durch Destillation von KOH und über „Linde“-Molekularsieben (Typ 4 Å) aufbewahrt. Schlangengift-Phosphodiesterase (E. C. 3.1.4.1.) wurde von Boehringer (Mannheim, BRD) bezogen.

²²⁾ A. F. Cook, M. J. Holman und A. L. Nussbaum, J. Amer. Chem. Soc. **91**, 6479 (1969).

²³⁾ A. W. Murray und M. R. Atkinson, Biochemistry **7**, 4023 (1968).

²⁴⁾ V. M. Clark, D. W. Hutchinson, G. W. Kirby und A. R. Todd, J. Chem. Soc. **1961**, 715; D. M. Brown, J. A. Flint und N. K. Hamer, ebenda **1964**, 326.

Darstellung des Polymeren: In einem 4-Liter-Dreihalskolben mit Heizpilz auf einer Schüttelmaschine wurden 33 g Moviol (Polyvinylalkohol) in 1.5 Liter bidest. Wasser bei 80°C unter Rückfluß und unter N₂ gelöst. Ein Gemisch von 66 g löslichem Polystyrol (Mol.-Masse 170000) in 133 g Diäthylbenzol, 36.8 g Divinylbenzol (55proz.), 364 g Styrol (Divinylbenzol und Styrol entstabilisiert und destilliert) und 3 g Azoisobutyrodinitril wurde unter kräftigem Schütteln in 15 min bei 80°C zugetropft und der Ansatz dann 24 h bei 80°C geschüttelt. Innerhalb von 90 min setzte die Polymerisation ein. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Polymere auf einer Fritte mehrmals mit heißem Wasser, Methanol und Benzol gewaschen, bis es von allen löslichen Bestandteilen befreit war, und bei 100°C i. Vak. über P₄O₁₀ getrocknet. Ausb. 95%.

Dimethoxytritylalkohol-Polymeres: 45 g Polystyrol (0.425 mol) ließ man in 300 ml Nitrobenzol 1 h vorquellen, setzte 25.5 g *p*-Anisoylchlorid (0.15 mol) und 14.0 g AlCl₃ (0.098 mol) zu und schüttelte 15 h bei Raumtemp. unter Ausschluß von Feuchtigkeit. Dann wurden 100 ml Wasser und 25 ml konz. Salzsäure zugegeben und nochmals 30 min geschüttelt. Das Polymere wurde auf einer Fritte intensiv mit 0,5 N HCl, Tetrahydrofuran + HCl, Methanol, Benzol und Äther gewaschen und bei 80°C i. Vak. getrocknet. Ausb. 51 g *p*-Methoxybenzophenon-Polymeres. Elementaranalyse: C 88.40, H 7.34, O 4.11; daraus berechnen sich 16% funktionelle Gruppen. Im IR tritt die C=O-Bande bei 1660 cm⁻¹ auf.

10 g *p*-Methoxybenzophenon-Polymeres ließ man in 30 ml absol. Tetrahydrofuran vorquellen. Aus 1.07 g Mg-Spänen (0.053 mol) und 10.0 g *p*-Bromanisol (0.053 mol) in 20 ml absol. Tetrahydrofuran wurde eine Grignard-Lösung bereitet und zur Suspension des Polymerketons gegeben. Das Gemisch wurde 20 h bei Raumtemp. geschüttelt, dann mit Wasser zersetzt und Essigsäure zugefügt. Das Polymere wurde intensiv mit verd. Essigsäure, Tetrahydrofuran und Äthanol gewaschen und über P₄O₁₀ i. Vak. bei 70°C getrocknet. Ausb. 11 g Dimethoxytritylalkohol-Polymeres. Elementaranalyse: C 87.20, H 7.26, O 5.45; daraus berechnen sich 16.4% funktionelle Gruppen oder 1.1 mmol/g Polymeres. Im IR zeigt sich keine Bande bei 1660 cm⁻¹ (C=O) mehr.

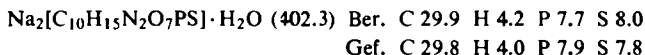
***p,p'*-Dimethoxytritylchlorid-Polymeres:** 11 g gut getrocknetes Dimethoxytritylalkohol-Polymeres wurden mit 100 ml absol. Benzol und 20 ml Acetylchlorid 2 h unter Rückfluß erwärmt. Nach Abkühlen wurden die flüchtigen Bestandteile so weit wie möglich entfernt, das Polymere mit 100 ml absol. Benzol gewaschen und erneut abgedampft. Zur Cl-Bestimmung wurden 500 mg mit 20 ml Tetrahydrofuran und 3 ml 1 N NaOH 30 min geschüttelt und titrimetrisch mit 0.1 N AgNO₃ nach Volhard 1.15 mmol Cl⁻/g Polymeres bestimmt.

Chlormethyl-Polymeres (P) — CH₂Cl: 5 g Polystyrol (mit 5% Divinylbenzol vernetzt) ließ man 1 h in 25 ml CH₃OCH₂Cl vorquellen, kühlte auf 0°C ab, gab 0.4 ml SnCl₄ in 10 ml CH₃OCH₂Cl zu und rührte unter Feuchtigkeitsausschluß 30 min bei 0°C. Das Polymere wurde auf einer Fritte intensiv mit Dioxan/Wasser (3:1), Wasser, Dioxan sowie Aceton gewaschen und bei 100°C i. Vak. über P₄O₁₀ getrocknet. Elementaranalyse: Cl = 2.67%; daraus berechnen sich 0.75 mmol funktionelle Gruppen/g Polymeres.

2',3'-(2,4-Dimethoxybenzyliden)-5'-pseudosaccharyl-cytidin (2): 3.91 g 2',3'-(2,4-Dimethoxybenzyliden)-cytidin (1) (10 mmol) in 250 ml absol. Pyridin wurden mit ca. 5 g Molekularsiebe (4 Å, Merck, Darmstadt, BRD) versetzt und über Nacht gerührt. Dann wurde auf -18°C abgekühlt (Aceton/Trockeneis), 2.21 g Pseudosaccharinchlorid (11 mmol) zugegeben, 10 h bei -17 bis -18°C gerührt, die Molekularsiebe abfiltriert und die Lösung i. Hochvak. eingedampft. Bei Zugabe von 200 ml Wasser fiel ein rosagefärbter Niederschlag aus, der abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen wurde. Nach Trocknen i. Vak. über KOH wurden 5.53 g Rohprodukt erhalten, durch PSC an Kieselgel im Laufmittel E (R_F 0.56, R_F von 1 0.28) gereinigt und mit Aceton 3.88 g = 70% glasartiges, chromatographisch reines Produkt

eluiert. Die Substanz konnte nicht kristallisiert werden. IR (KBr): intensive Bande bei 3250 cm^{-1} (NH_2 -Gruppe); UV (Methanol): λ_{max} 274 nm, λ_{min} 253 nm, λ_{max} 233 nm. Bei 2stdg. Behandlung mit konz. NH_3 in Pyridin wurde die Pseudosaccharyl-Gruppe aus **2** (R_F 0.56) nach chromatographischer Analyse quantitativ zu **1** (R_F 0.28) abgespalten.

Thymidin-5'-phosphorothioat (11): 570 mg (2 mmol) 3'-O-Acetyl-thymidin wurden in 5 ml Triäthylphosphat gelöst, auf 0°C abgekühlt und 0.7 ml (6.5 mmol) PSCl_3 und 0.24 ml (3 mmol) Pyridin zugegeben. Nach langsamem Erwärmen auf Raumtemp. wurde es dabei $5\frac{1}{2}$ h belassen. Dann versetzte man unter Kühlung mit 20 ml 10proz. Bariumacetatlösung und hielt die Lösung durch mehrmaliges Zufügen von wenig Pyridin auf pH 1.5–2. Nach 50 min wurden 5 ml Triäthylamin und 90 ml Äthanol zugesetzt, der Niederschlag abfiltriert und dreimal mit je 40 ml 80proz. Äthanol gewaschen. Danach extrahierte man dreimal mit je 50 ml Wasser. Die wäbr. Lösung, die außer 3'-O-Acetyl-thymidin-5'-phosphorothioat auch deacyliertes Produkt enthielt, wurde eingeengt und 2 h mit konz. NH_3 behandelt, dann eingedampft, auf eine DEAE-Cellulose-Säule (HCO_3^- -Form, $2.5 \times 35\text{ cm}$) gegeben, mit einem Gradienten (750 ml Wasser + 750 ml 0.5 M Ammoniumhydrogencarbonat) eluiert und Fraktionen von etwa 10 ml gesammelt. Das Produkt wurde bei einer Pufferkonzentration von 0.24–0.32 eluiert. Die Fraktionen wurden vereinigt, das Salz durch mehrmaliges Einengen mit Wasser, Äthanol am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt in das Natriumsalz übergeführt und im Kühlschrank aufbewahrt. Ausb. 14200 A_{267} -Einheiten (1.48 mmol) = 74%.



Beladung des Dimethoxytritylchlorid-Polymeren mit 2 zu 4 über 3: 330 mg **2** (0.60 mmol) wurden dreimal mit 5 ml absol. Pyridin abgedampft, in 4 ml absol. Pyridin aufgenommen und 300 mg Dimethoxytritylchlorid-Polymeres (1.1 mmol Dimethoxytrityl-Gruppen/g Polymeres) zugegeben. Der Kolben wurde fest verschlossen, 6 d bei Raumtemp. geschüttelt, dann 1 ml Methanol zugesetzt und nochmals 2 h geschüttelt. Das Polymere wurde auf einer Fritte fünfmal mit Pyridin, dreimal mit Tetrahydrofuran und zweimal mit Petroläther ($30\text{--}60^\circ\text{C}$) gewaschen. Im IR traten starke Banden bei 1660 ($\text{C}=\text{O}$) und 1630 ($\text{C}=\text{N}$) sowie eine schwache Bande bei 1710 cm^{-1} ($\text{C}=\text{N}$ der Pseudosaccharyl-Gruppe) auf.

Zur Abspaltung der Pseudosaccharyl-Gruppe (3 \rightarrow 4) wurde das beladene Polymere in 10 ml Pyridin mit 5 ml konz. NH_3 versetzt, 15 h bei Raumtemp. geschüttelt und danach wie oben gewaschen. Im IR war die Bande bei 1710 cm^{-1} verschwunden.

Zur Bestimmung des Beladungsgrades wurden 10.4 mg beladenes Polymere 15 min mit 5proz. $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ bei Raumtemp. hydrolysiert und dann 3 Tropfen konz. NH_3 und 3–4 ml Methanol zugegeben. Nach 10 min wurde das Polymere abfiltriert und fünfmal mit Pyridin sowie dreimal mit Methanol gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt, eingeengt und der Rückstand papierchromatographisch im Laufmittel A aufgearbeitet. Der Cytidin-Fleck wurde mit Wasser eluiert und das Cytidin spektrophotometrisch bestimmt ($\epsilon_{271\text{ nm}} = 9100$). Ausb. (Mittel aus zwei Bestimmungen): 4440 A_{271} -Einheiten = 0.49 mmol 2/g Polymeres. Weitere Ergebnisse s. Tab. 1.

Darstellung von Oligonucleotiden durch (mehrfache) Kondensation von 4 mit geschützten Nucleotiden (4 \rightarrow 7) und nachfolgendes Abspalten der Schutzgruppen sowie Abspalten vom Polymeren (7 \rightarrow 10): 250 mg **4** (0.36 mmol Cytidin/g Polymeres) und 0.5 mmol 3'-O-Acetylthymidin [pdT(Ac)] (\approx 5facher Überschuß, bez. auf Cytidin) wurden durch dreimaliges Abdampfen mit je 10 ml absol. Pyridin azeotrop getrocknet. Zum Rückstand gab man eine Lösung von 450 mg (1.5 mmol) 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS-Cl) in 7 ml

Tab. 1. Beladung des Dimethoxytritylchlorid-Polymeren mit **2** bei Raumtemperatur

Funktionelle Gruppen am Polymeren (mmol/g Polymeres)	Überschuß an 2 (bez. auf funktionelle Gruppen am Polymeren)	Reaktionszeit (h)	Beladungsgrad (mmol 2/g Polymeres)
1.1	2fach	144	0.49
1.1	1.2fach	100	0.35
0.8	2fach	86	0.26
1.1	1.3fach	144	0.29

absol. Pyridin und schüttelte das Gemisch 9 h bei Raumtemp. Darauf wurde die Lösung vorsichtig vom Polymeren dekantiert, 10 ml Pyridin/Wasser (9:1, v/v) zugesetzt und 2–3 h geschüttelt. Dann wurde das Polymere auf einer Fritte dreimal mit Pyridin, dreimal mit Pyridin/Wasser (9:1, v/v), zweimal mit Tetrahydrofuran, zweimal mit Methanol und zum Schluß mit Petroläther gewaschen. IR: starke Bande bei 1740 cm^{-1} (3'-O-Acetyl).

Die Abspaltung der 3'-O-Acetyl-Gruppe (5→6) erfolgte mit Pyridin/25proz. $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}^+\text{OH}^-$ (9:1, v/v) durch 30 min Schütteln bei Raumtemp. und Waschen wie oben. Danach konnte der nächste Kondensationsschritt durchgeführt werden.

Zur Bestimmung der Kondensationsausbeute wurde eine kleine Menge (11.8 mg) Polymeres mit 1 ml 5proz. $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 20 min bei Raumtemp. hydrolysiert (s. oben). Das Nucleotidmaterial wurde mit 0.5 ml 0.05 M $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ sowie 0.5 ml 0.2 M NaJO_4 versetzt, nach 2 h wurde 0.5 ml 0.05 M Glucoselösung zugegeben und noch 1 h stengelassen. Dann wurden 1.5 ml konz. Ammoniak zugefügt, die Lösung 15 h bei Raumtemp. belassen, eingengt und der Rückstand an Papier im Laufmittel A chromatographiert. Der Thymidin-Fleck wurde mit Wasser eluiert und spektrophotometrisch bestimmt. Ergebnis: 20.8 A_{267} -Einheiten = 1760 A_{267} -Einheiten/g Polymeres.

Die Oligothymidylsäuren bis $(\text{pdT})_5$ sowie die gemischten Oligonucleotide pdTpdApdT und pdTpdGpdT wurden durch mehrfache Wiederholung des Kondensationszyklus in analogen Ansätzen und nachfolgende Abspaltung synthetisiert, wobei in den letzteren Fällen anstelle von $\text{pdT}(\text{Ac})$ die geschützten Mononucleotide $\text{pdbz}^6\text{A}(\text{Ac})$ bzw. $\text{pdac}^2\text{G}(\text{Ac})$ eingesetzt

Tab. 2. Charakterisierung der über 4 dargestellten Desoxyoligonucleotide

Desoxyoligo-nucleotid	% Ausbeute *)	R_F -Wert **) (Laufmittel C)	Spaltung mit Phosphodiesterase
$(\text{pdT})_2$	51	0.89	quantitativ
$(\text{pdT})_3$	49	0.73	quantitativ
$(\text{pdT})_4$	34	0.64	quantitativ
$(\text{pdT})_5$	26	0.54	quantitativ
pdTpdA	28	0.51	$\text{pdT}:\text{pdA}$ (1.0:0.95)
pdTpdApdT	25	0.35	$\text{pdT}:\text{pdA}$ (2.0:0.87)
pdTpdG	21	0.43	$\text{pdT}:\text{pdG}$ (1.0:0.95)
pdTpdGpdT	26	0.32	$\text{pdT}:\text{pdG}$ (2.0:0.90)

*) Bezogen auf die vorhergehende Stufe.

**) Bezogen auf pdT .

wurden. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte wie oben; die Extinktionskoeffizienten der Oligothymidylsäuren wurden aus der Literatur⁵⁾, die der gemischten Oligonucleotide durch Addition der Werte der Monomeren ohne Berücksichtigung der Hyperchromie erhalten. Die Oligonucleotide wurden in Mengen zwischen 0.1 und 0.7 mg isoliert.

Zur Charakterisierung der Produkte s. Tab. 2.

Beladung des Chlormethyl-Polymeren (P)-CH₂Cl mit Thymidin-5'-phosphorothioat (11) zu 12: 1 g (P)-CH₂Cl (0.75 mmol Cl⁻/g Polymeres) wurden zu einer Lösung von 1.04 mmol 11 (Na-Salz) in 5 ml Dimethylformamid gegeben und das Gemisch 24 h bei 60°C geschüttelt. Das Polymere wurde danach mit Pyridin/Wasser (3:1, v/v), Methanol und Petroläther gewaschen. Im IR zeigte sich eine intensive Bande bei 1670 cm⁻¹ (C=O von Thymidin). Dieselbe Synthese mit einem käuflichen Polymeren (BioRad Laboratories, Richmond, California, USA) lieferte schlechtere Ausbeuten.

Um die nicht umgesetzten CH₂Cl-Gruppen zu blockieren, wurde das Polymere 1 h mit Pyridin/2 N Na-Methylat in Methanol (6:1, v/v) geschüttelt.

Zur Bestimmung des Beladungsgrades wurden 10.4 mg 12 mit 10 mg Jod in 2 ml Pyridin/Wasser (3:1, v/v) 22 h bei Raumtemp. geschüttelt. Man filtrierte das Polymere auf einer Fritte ab, wusch je dreimal mit Pyridin, Pyridin/Wasser (4:1, v/v) sowie Wasser und engte die Filtrate ein. Der Rückstand wurde mit 5 ml Wasser aufgenommen und zweimal mit 30 ml Äther extrahiert. Die wäbr. Phase wurde eingeeengt und im Laufmittel C chromatographiert. Ergebnis: 29.6 A₂₆₇-Einheiten pdT sowie 3.30 A₂₆₇-Einheiten pdTp [R_F 0.54, identifiziert durch chromatographischen Vergleich mit pdTp im System C und in Äthanol/1 M Ammoniumacetat (7:3, v/v) pH 3.5; bei der Behandlung mit Acetanhydrid/Pyridin nach 15 h unverändert; mit alkalischer Phosphatase (Tris-Puffer pH 8.6, 3 h, 37°C) quantitative Bildung von Thymidin] d. h. insgesamt 3200 A₂₆₇-Einheiten/g Polymeres = 0.33 mmol pdT/g Polymeres. Weitere Beladungen s. Tab. 3.

Tab. 3. Beladung des Chlormethyl-Polymeren (P)-CH₂Cl mit Thymidin-5'-phosphorothioat (11)

Funktionelle Gruppen am Polymeren (mmol/g Polymeres)	Überschuß an 11 (bez. auf funktionelle Gruppen am Polymeren)	Reaktionszeit (h)	Lösungsmittel	Temperatur (°C)	Beladungsgrad (mmol pdT/g Polymeres)
1.2	1.4fach	45	DMF ^{*1}	60	0.41
0.75	1.3fach	24	DMF ^{*1}	60	0.33
0.75	1.0fach	12	DMF/HPT ^{**1}	60	0.27
0.75	1.0fach	6	DMF ^{*1}	60	0.26
0.75	0.75fach	4	DMF ^{*1}	50	0.08
0.75	0.6fach	7.5	DMF ^{*1}	50	0.18

*¹ DMF = Dimethylformamid.

**¹ DMF/HPT = Dimethylformamid/Hexamethylphosphorsäuretriamid (3.5:1, v/v).

Darstellung von Oligonucleotiden durch (mehrfache) Kondensation von 12 mit geschützten Nucleotiden und nachfolgendes Abspalten der Schutzgruppen sowie Abspaltung vom Polymeren (13→14): 100 mg 12 (0.175 mmol pdT/g Polymeres) und 0.175 mmol 3'-O-Acetyl-thymidin [pdT(Ac)] wurden mit absol. Pyridin azeotrop getrocknet und nach Zugabe von 0.44 mmol (133 mg) TPS-Cl in 1.5 ml absol. Pyridin 6 h umgesetzt. Dann folgte die schon beschriebene Aufarbeitung.

Die Abspaltung der 3'-O-Acetylgruppe gelang durch 25 min Schütteln in 5 ml absol. Pyridin/2 N Na-Methylat in Methanol (9:1, v/v) bei Raumtemp. Anschließend wurde wie oben beschrieben gewaschen.

Die Abspaltung des Oligonucleotides vom Polymeren und die Bestimmung der Ausbeute erfolgte wie bei der Ermittlung des Beladungsgrades.

(pdT)₅ und die gemischten Trinucleotide pdTpdan⁴CpdT und pdTpdbz⁶ApdT wurden in analogen Ansätzen unter z. T. leicht veränderten Bedingungen (Tab. 4) durch wiederholtes Ancondensieren der geschützten Nucleotide pdT(Ac) bzw. pdan⁴C(Ac) bzw. pdbz⁶A(Ac) synthetisiert. Die Bestimmung der Ausbeuten erfolgte wie oben.

Die Abspaltung der N-Schutzgruppen erfolgte mit konz. Ammoniak während 48 h bei Raumtemp. vor der enzymatischen Spaltung und der chromatographischen Trennung. Die Bestimmung der Ausbeuten erfolgte wie oben. Die Oligonucleotide wurden in Mengen zwischen 0.1 und 0.7 mg isoliert.

Zur Charakterisierung der Oligonucleotide s. Tab. 4.

Tab. 4. Charakterisierung der über 12 dargestellten Desoxyoligonucleotide

Desoxyoligo-nucleotid	% Ausbeute *)	R _F -Wert	Spaltung mit Phosphodiesterase
(pdT) ₂	39	0.70 **)	quantitativ
(pdT) ₃	25	0.39 **)	quantitativ
(pdT) ₄	19	0.64 ***)	quantitativ
(pdT) ₅	21	0.54 ***)	quantitativ
pdTpdC	23	0.48 **)	
pdTpdCpdT	18	0.34 **)	pdT:pdC (2.0:0.90)
pdTpdA	21	0.49 **)	
pdTpdApdT	25	0.34 **)	pdT:pdA (2.0:0.95)

*) Bezogen auf die vorhergehende Stufe.

***) Relativ zu pdT im Laufmittel B.

**) Relativ zu pdT im Laufmittel C.

[297/73]