

LIQUID-PHASE-SYNTHESE VON NUCLEOTIDEN

F. Brandstetter, H. Schott u. E. Bayer⁺

Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Tübingen

D 74 Tübingen-1, Auf der Morgenstelle

(Received in Germany 12 June 1973; received in UK for publication 25 June 1973)

Die kürzlich entwickelte Synthese von Polypeptiden an löslichen Trägern^{1,2} vereinigt Vorteile von Festkörpersynthese und trägerfreier, klassischer Peptidsynthese. Die Verwendung von löslichen Polymeren führt zu einer Kupplungskinetik, wie sie mit niedermolekularen Komponenten erzielt wird. Überschuß an Reagentien und niedermolekulare Verunreinigungen können leicht durch Ultrafiltration oder Gelfiltration abgetrennt werden. Dadurch wird eine einfache und schnelle Peptidsynthese ermöglicht, die automatisierbar ist.

Diese Vorteile der liquid-phase-Synthese sind auch für die Darstellung von anderen Biopolymeren anwendbar. Es war daher naheliegend, die bei Peptiden bewährten Träger und Verfahren auch zur Synthese von Nucleotiden heranzuziehen³. In noch stärkerem Ausmaß als bei der Peptidsynthese hat das Festkörperverfahren bei Nucleotidsynthesen Schwierigkeiten bereitet und Polynucleotide sind bisher nur mit der trägerfreien Synthese nach der Methode von Khorana et al.⁴ dargestellt worden. Lösliches unvernetztes Polystyrol hat ebenfalls keine Anwendung gefunden, da dieses während der Kupplungsschritte zunehmend unlöslich wurde^{6,7}. Diese Schwierigkeiten werden nicht beobachtet, wenn die bereits bei Peptidsynthesen verwendeten löslichen Polymere herangezogen werden.

Die von uns zur Oligonucleotidsynthese benutzten löslichen polymeren Träger enthalten funktionelle Gruppen, welche die Verankerung des ersten Nucleotids oder Nucleosids erlauben und gute Löslichkeit unter allen Synthesebedingungen bewahren. Das Molekulargewicht muß auf die nach jedem Kupplungsschritt benutzte Trennmethode abgestimmt werden. Polyäthylenglykole

(PEG), Polyvinylalkohole (PVA) und Polyäthylenimine sind Basispolymere, die von uns zur Nucleotidsynthese verwendet werden. Die Auswahl des makromolekularen Trägers richtet sich nach der Synthesestrategie. Bei der Synthese von Oligo-desoxyribonucleotiden am Träger können zwei Strategien unterschieden werden: Die Synthese von kleineren Fragmenten, die nach Abspaltung unter Erhaltung der Schutzgruppe zu größeren Polynucleotiden zusammengesetzt werden, oder die Synthese von längeren Polynucleotiden.

Im ersten Fall ist das Synthesziel ein geschütztes Oligonucleotid mit einer terminalen 5'-Phosphat-Gruppe. Die Verankerung des ersten Nucleotids an das Polymer erfolgt hier über eine Phosphoramid- oder Thiophosphorsäureester-Bindung. Das erste Nucleotid wird an die endständigen Aminogruppen von ω, ω' -Diaminopolyäthylenglykol⁸ oder Polyäthylenimin mit Dicyclohexylcarbodiimid gekuppelt. Die gebildete Phosphoramidbindung kann nach der Synthese mit Isoamylnitrit/Eisessig/Pyridin⁹ oder Jod bzw. Brom gespalten werden. Polymere mit Hydroxylgruppen, wie Polyvinylalkohol oder Polyäthylenglykol werden zunächst mit β -Bromäthylphosphat oder 1,3-Dibromisopropylphosphat mittels TPS oder MS als Kondensationsmittel verestert. Der erste Baustein wird über den Thiophosphorsäureester am Träger verankert. Diese Thiophosphatbindung wird nach der Synthese vorzugsweise durch Jod gespalten¹⁰. Die Ausbeute der Funktionalisierung der Basispolymere liegt maximal zwischen 60 und 90 %. Die für die Nucleotidbindung vorgeschlagene Einführung von Tritylgruppen in Polyäthylenglykol hat sich nach unseren Untersuchungen nicht bewährt, da die Löslichkeitseigenschaften durch die Tritylgruppen schlechter werden und die Ausbeuten mit 10 - 20 % zu geringe Beladung erlauben.

Polynucleotide mit freien 5'-Hydroxylendgruppen werden als Syntheseprodukte erhalten, wenn die aufzubauende Nucleotidkette über eine Ribo-Desoxyribointernucleotidbindung am Polymer verankert wird.

Polymere mit geringer Beladbarkeit, aber sterisch frei zugänglichen funktionellen Gruppen auf Polyäthylenglykolbasis sind für die Darstellung längerer Oligonucleotide besonders geeignet. Am Beispiel der Synthese des Trinucleotids d(pA-A-A) und des Pentanucleotids d(T-T-T-T-T) sollen beide Synthesemethoden aufgezeigt werden.

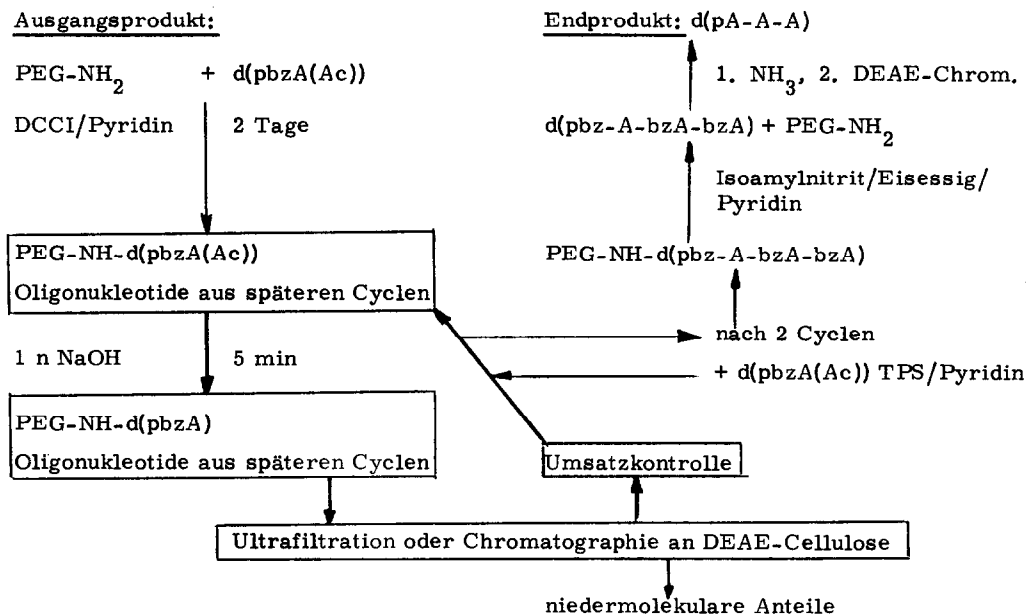


Abb. 1: Reaktionsschema für die Liquid-phase-Synthese von Nucleotiden

Nach dem ersten Konzept wird das Trinucleotid mit Hilfe von Diamino-polyäthylenglycol (MG \approx 10 000) synthetisiert (vgl. Abb. 1). Nach den Kupplungsschritten werden die niedermolekularen Anteile durch Ultrafiltration oder Chromatographie an DEAE-Cellulose entfernt. Der Umsatz wird titrimetrisch bestimmt, da UV-Messungen keine zuverlässigen Ergebnisse bringen. Bei den einzelnen Kupplungsschritten werden folgende Ausbeuten erzielt:

PEG-NH — d(pbzA) 70 % ; PEG-NH — d(pbzA-bzA) 60 % ; PEG-NH — d(pbzA-bzA-bzA) 40%

Nach der Abspaltung des Trinucleotids vom Träger, Entfernung der Schutzgruppe und der chromatographischen Aufreinigung an DEAE-Cellulose werden 14 % an reinem d(pA-A-A) isoliert. Das Trinucleotid wird durch Papierchromatographie, UV-Messung und enzymatischen Abbau identifiziert und charakterisiert.

Eine kurze Beschreibung der Synthese des Pentanucleotids d(T-T-T-T-T) soll die zweite Synthesestrategie verdeutlichen: 1 g Polyvinylalkohol (MG \approx 70 000) wird mit 6 mM pU funktionalisiert¹². Jede Kupplung wird mit 6-10 mM d(pT(Ac)) während 24-36 Std. durchgeführt. Als Kondensationsmittel verwendet man TPS. Nach der Kondensation wird mit Äther ausgefällt, in Wasser gelöst, die 3'-O-Acetylgruppe mit 1 n NaOH abgespalten und ultrafiltriert. Das Reten-

dat wird im Vakuum eingengt, mit Hexamethylphosphorsäuretriamid versetzt und zur Entfernung des Wassers mehrmals mit Pyridin abrotiert. Anschließend kann ein neuer Kondensationscyclus erfolgen. Der Umsatz wird durch UV-Messung bestimmt.

Nach fünf Schritten sind am PVApU-Träger 24900 A₂₆₀-Einheiten gebunden, die einer Gesamtausbeute von 39 % entsprechen. Der beladene Träger wird 18 Std. bei 37° C mit 0,3 KOH behandelt. Das neutralisierte Hydrolysat trennt man anschließend an DEAE-Cellulose mit steigenden Salzgradienten. 19300 A₂₆₀-Einheiten werden isoliert. Die Gesamtausbeute des Pentanucleotids d(T-T-T-T) beträgt 8 %, entsprechend 1.500 A₂₆₀-Einheiten.

Der große Vorteil dieses Verfahrens ist der geringe Arbeits- und Zeitaufwand, die leichte analytische Kontrolle und die Möglichkeit der Automatisierung der Polynucleotidsynthese. Ribonucleotide sind mit dieser Methode durch enzymatische Kupplung dargestellt worden.

Literatur

- 1) M. Mutter, H. Hagenmaier u. E. Bayer, *Angew. Chemie* 83, 883 (1971)
- 2) E. Bayer u. M. Mutter, *Nature* 237, 512 (1972), 495 (1972), *Nachr. Chem. Techn.* 20, 495 (1972)
- 3) E. Bayer, F. Brandstetter, W. König, M. Mutter u. R. Uhmman, unveröffentlicht
- 4) H. G. Khorana et al., *Angew. Chemie* 84, 489 (1972)
- 5) R. L. Letsinger u. V. Mahadevan, *J. Amer. Chem. Soc.* 87, 3526 (1965)
- 6) H. Hayatsu u. H. G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.* 88, 3182 (1966)
- 7) F. Cramer et al., *Angew. Chemie*, 78, 640 (1966)
- 8) F. Brandstetter, Diplomarbeit, Universität Tübingen 1972
- 9) E. Ohtsuka, K. Murao, M. Ubasawa u. M. Ikehara, *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 3441 (1970)
- 10) A. F. Cook, *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 190 (1970)
- 11) H. Köster, *Tetrahedron Letters*, 1972, 1535
- 12) H. Schott, *Angew. Chemie* 85 263 (1973)