

NEUE POLYMER-SCHUTZGRUPPE IN DER OLIGONUCLEOTIDSYNTHESE,
2-HYDROXYÄTHYLPHENYLTHIOÄTHER VON POLYÄTHYLENGLYKOL.

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

Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Tübingen

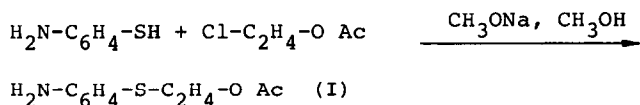
D 74 Tübingen 1, Auf der Morgenstelle

(Received in Germany 8 June 1974; received in UK for publication 24 June 1974)

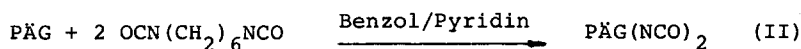
Nach der von uns entwickelten liquid-phase-Synthese von Oligonucleotiden wird das 5'-Phosphatende einer aufzubauenden Nucleotidkette mit löslichen polymeren Schutzgruppen substituiert und anschließend schrittweise am 3'-Ende zum definierten Oligonucleotid verlängert ^{1,2,3}). Die Synthese kann entweder nach dem von Khorana ausgearbeiteten Verfahren oder nach der Triestermethode erfolgen. Ein wesentlicher Vorteil bei der Verwendung polymerer Schutzgruppen liegt in der bedeutend schnelleren und einfacheren Isolierung der erwünschten Kondensationsprodukte. Gleichzeitig lassen sich die im Überschuss eingesetzten Nucleotidblöcke fast quantitativ in reiner Form zurückgewinnen.

Wir haben gefunden, daß die 5'-Phosphatgruppe von Nukleotiden mit dem 2-Hydroxyäthylphenylthioäther von Polyäthylenglykolen (PÄG) geschützt werden kann. Ein wesentlicher Vorteil dieser neuen Schutzgruppe liegt darin, daß man sie unter Bedingungen abspalten kann, unter denen Schutzgruppen der Nucleobasen stabil sind ⁴⁾. Die Synthese erfolgt nach folgendem Reaktionsschema:

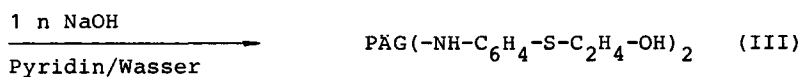
1. p-Aminophenyl-2-acetyläthylthioäther (I):



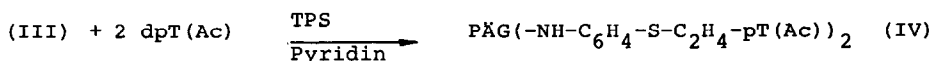
2. Diisocyanat von Polyäthylenglykol PÄG(NCO)₂ (II) :



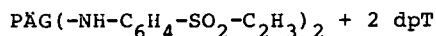
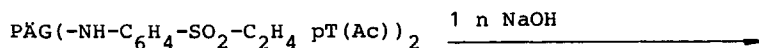
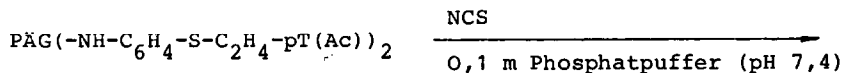
3. Addition von PÄG(NCO)₂ an (I) :



4. Verknüpfung des Nucleotids dpT(Ac) an (III) :



5. Abspaltung der Schutzgruppe von dpT(Ac) :



Die Darstellung der polymeren Schutzgruppe, ihre Verknüpfung mit dem Nukleotid und die Abspaltung des Nukleotids geschieht nach folgenden

Vorschriften: (I) · 12,5 g (0,1 Mol) p-Mercaptoanilin werden in 60 ml absol. Methanol gelöst und unter Kühlen und Rühren mit 5,4 g (0,1 Mol) Natriummethylat versetzt. Zu der Lösung gibt man 18,3 g (0,15 Mol) 2-Chloräthylacetat und läßt 12 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wird das Methanol im Vakuum bei 40° C abgezogen und der Rückstand destilliert. Sdp. 202°₂ C; Ausbeute 15,3 g (72 %). Eine weitere Reinigung erfolgt an Kieselgel-Säule in Benzol/Methanol (95/5 v/v). R_f 0,47 (in Benzol/Methanol 95/5 v/v) Kieselgelplatte.

Diisocyanat von Polyäthylenglykol (PÄG-NCO)₂ (II) ⁴⁾. Eine Lösung von 30 g (5 mMol) PÄG (MG ≈ 6.000), 8,6 ml (50 mMol) Hexamethylendiisocyanat und 2 ml Pyridin in 200 ml Benzol wird 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlenlassen fällt man mit Petroläther (30 - 50° C) aus, saugt ab, wäscht mit Äther nach und fällt aus Benzol mit Petroläther um. Ausbeute: ≈ 28 g (90 %).

Reaktion von (I) mit (II). 15 g (2,5 mMol) PÄG-(NCO)₂ (MG ≈ 6.000) und 2,1 g (10 mMol) p-Aminophenyl-2-acetyläthylthioäther werden in 100 ml Benzol und 1 ml Pyridin 5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Ausfällen mit Äthanol wird die Acetylgruppe mit 1 n NaOH in Wasser/Pyridin verseift. Ausbeute: 14,4 g (≈ 90 %).

Derivatisierung von dpT (Ac) mit (III). 2,2 g (5 mMol) dpT (Ac) werden in Pyridin mit 4,5 g (15 mMol) Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid vorbehandelt. Dazu gibt man eine Lösung von 7,5 g (1,25 mMol) der Polymerenschutzgruppe (III) in Pyridin. Nach 10 Stdn. wird in Äther ausgefällt, dekantiert, in Petroläther suspendiert und abfiltriert. Der in Wasser gelöste Rückstand wird an einer DEAE-Cellulose-Säule (60 cm/3 cm) aufgetrennt. Ausbeute: 8,7 g (≈ 90 %).

Abspaltung der polymeren Phosphatschutzgruppe von dpT (Ac).

3 g (0,8 mMol) des Produktes (IV) werden in 20 ml 0,1 m Phosphatpuffer (pH 7,4) 10 Min. bei Raumtemperatur mit 266 mg N-Chlorsuccinimid (NCS) behandelt. Nach dem Abkühlenlassen auf 0° C versetzt man mit 20 ml 2 n NaOH. Hierbei wird der Thioäther zum Sulfon oxidiert^{5,6)}. Nach 5 Min. wird mit Dowex 50 x 8 (H⁺-Form) neutralisiert. Man filtriert ab, wäscht mit Wasser nach und trennt die Produkte an DEAE-Cellulose auf. Zunächst eluiert man mit Wasser die nicht absorbierten Produkte, während im linearen TEAB-Puffer-Gradienten absorbierte Nukleotide eluiert werden.

Literatur

1. F. Brandstetter, H. Schott und E. Bayer, Tetrahedron Letters 1973, 2997.
2. H. Schott, F. Brandstetter und E. Bayer, Makromol.Chem. 173, 247 (1973).
3. H. Schott, Angew.Chem. 85, 263 (1973).
4. I.L. Gatfield, persönliche Mitteilung.
5. K.L. Agarwal, M. Fridkin, E. Jay and H.G. Khorana, J.Am.Chem.Soc. 95, 2020 (1973).
6. S.A. Narang, O.S. Bhanot, J. Goodchild, J. Michniewicz, R.H. Wightmann, and S.K. Dheer, J.Am.Chem.Soc. 94, 6183 (1972).