

TRIESTER-FESTPHASENSYNTHESE VON OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDEN  
AN POLYSTYREN-TEFLON TRÄGERN

A. Rosenthal, D. Cech\*

Sektion Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin, DDR-1040 Berlin,  
Invalidenstr. 42

V.P. Veiko, T.S. Orezkaja, E.A. Kuprijanova, Z.A. Shabarova  
Chemische Fakultät und A.N. Belozersky Institut für Molekularbiologie  
und Bioorganische Chemie der Moskauer Staatlichen Universität,  
117234 Moskau, UdSSR

A simple solid phase method for the synthesis of oligodeoxyribonucleotides on a grafted polystyrene-TEFLON support has been employed using the phosphotriester approach in 5'-3' direction. As a control of the reactions a semi-quantitative pyrolysis mass spectrometry approach for analyzing of the polymer-bound oligonucleotides was developed.

In den letzten drei Jahren sind neben dem Phosphit-Triesterverfahren an Kieselgel<sup>1</sup> eine Reihe von leistungsfähigen Phosphor-Triesterverfahren an unterschiedlichen Trägermaterialien wie Polydimethylacrylamid<sup>2</sup>, Polyacrylmorpholid<sup>3</sup>, Cellulose<sup>4</sup>, Glas<sup>5</sup>, Polystyren<sup>6</sup> und dem Copolymer Polystyren-Teflon<sup>7</sup> entwickelt und in der Synthese einer großen Anzahl von Oligonucleotiden mit Kettenlängen von 3 bis 31 Einheiten erfolgreich eingesetzt worden. Als Träger für automatisierte Festphasensynthesen eignen sich davon nur Polystyren, Polystyren-Teflon und Kieselgel. Polare Trägermaterialien wie Polyacrylamide sind nur dann für den automatischen Betrieb geeignet, wenn sie in eine anorganische Matrix z.B. Kieselgur eingebettet werden<sup>8</sup>. Obwohl schon 1978 von Potapov et al. Polystyren-Teflon als erstes Trägermaterial erfolgreich in halbautomatischen Syntheseparametern eingesetzt wurde<sup>9</sup>, hat die zunächst stärkere Hinwendung einiger Synthesegruppen zu polaren Trägermaterialien die Erprobung unpolarer Träger in der Triestermethode verzögert. In jüngster Zeit erleben allerdings Polystyren- und Polystyren-Teflon-Träger eine Renaissance in der Triestermethode<sup>6,7</sup>.

Im Unterschied zu allen anderen Festphasensynthesen nach dem Triesterverfahren, bei denen die Kette in 3'-5' Richtung verlängert wird, erfolgt die Kettenverlängerung in dem Triesterverfahren an Polystyren-Teflon mit Hilfe von Mono- und Dimerblöcken nach dem bereits 1981 von Potapov et al.<sup>7a</sup> entwickelten Schema in 5'-3' Richtung (Abb. 1). Dies hat die Vorteile, daß erstens die in der Synthese eingesetzten Überschüsse an Mono- oder Dimeren (Nucleosidkomponente) durch Kieselgelchromatographie zurückgewonnen werden können, zweitens während der Kondensation keine Sulfonierung von polymer gebundenen Hydroxylgruppen auftritt und daß drittens Depurinisierung beim Abspalten der Cyanoethylschutzgrup-



macia) gesteuert. Für die Synthesen wurden ca. 100-500 mg Polymer eingesetzt. Bei Verwendung von weniger als 150 mg Polymer ist eine Kreislaufführung der Reagenzien nicht mehr notwendig. Polymer gebundene Nucleosid-3'-phosphorsäuretriestere wurden durch 16 h Reaktion von  $\text{P}(\text{MeO})\text{Tr-Cl}$  mit den Nucleosid-3'-phosphorsäuretriestern in Pyridin erhalten<sup>9</sup> ( $d\text{Tp}=115$ ,  $dbz\text{Ap}=77$ ,  $dbz\text{Gp}=97$  und  $dbz\text{Cp}=92 \mu\text{mol/g}$  Träger). TPS wurde in 3fachem, Tetrazol, 1-Methylimidazol in 9fachen und die Nucleosidkomponente in 10fachen Überschuß in bezug auf die polymere Phosphatkomponente eingesetzt. Die Cyanoethylgruppe wurde mit Pyridin/ $\text{Et}_3\text{N}/\text{H}_2\text{O}$  (3:1:1, v/v/v) in 30 Minuten abgespalten. Alle Operationen eines Zyklus gibt Tab. 1 an (für 100-150 mg Polymer).

Tab. 1

Operation	Reagenz	Menge (ml)	Zeit (min)
1	Pyridin/ $\text{Et}_3\text{N}/\text{H}_2\text{O}$ (3:1:1, v/v/v)	1 x 5	30
2	trockenes Pyridin	3 x 5	5
3	Mono- oder Dimerblock in 0,5 ml trockenem Pyridin + TPS/Tetrazol (a) oder 1-Methylimidazol (b)		120 (a) <sup>+</sup> 30 (b) <sup>+</sup>
4	Pyridin	3 x 5	5

<sup>+</sup>Gesamtzeit für den Zyklus 160 (a) bzw. 70 Minuten (b). Um eine genügend hohe Ausbeute der sterisch gehinderten Reaktion des ersten Dimerblocks 2 ( $n=2$ ) mit dem polymer gebundenen Nucleotid 1 zu erhalten, muß aufgrund kinetischer Untersuchungen die Kondensationszeit für beide Kondensationsmittel auf 4-5 h verlängert werden.

Nach jeder Kondensation wurden jeweils kleine Polymermengen (5 mg) dem Reaktor entnommen mit EtOH und Ether gewaschen, i.V. getrocknet, pulverisiert und massenspektrometrisch untersucht. Daneben wurden, um eindeutige Aussagen über die Ausbeuten der Kondensationsreaktionen zu gewinnen, das Oligonucleotidmaterial mit 2% TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bei  $-20^\circ\text{C}$  (N- und P-Schutzgruppen wurden vorher mit  $\text{NH}_3$  in Pyridin bei  $50^\circ\text{C}$ , 12 h entfernt) abgespalten und durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose mit linearem NaCl-Gradienten in 7 M Harnstoff, 0,01 M Tris HCl, pH 7,5 oder an Li chrosorb mit linearem Phosphat-Gradienten in Mikromaßstab aufgetrennt (Abb. 2).

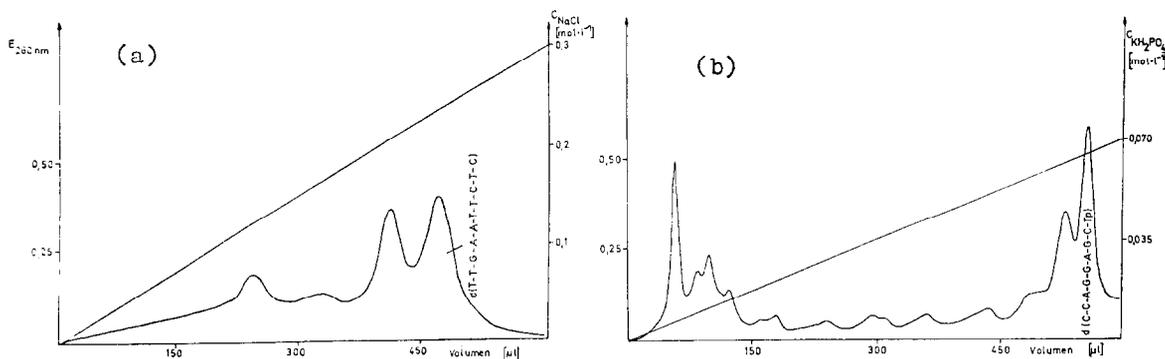


Abb. 2: Mikroionenaustauschchromatographie von  $d(\text{TTGAAATCTC})$  an DEAE-Cellulose (a) und  $d(\text{CCAAGGAGCTp})$  an Li chrosorb (b)

Für d(TTGAATTCTC) wurden dabei Reaktionsausbeuten (rechnerische Ermittlung aus den Peakflächen) von 58, 78, 82, 100 und 85% ermittelt, die in Einklang mit den massenspektrometrisch gewonnenen Werten stehen. Alle Oligonucleotide wurden als Hauptprodukte nach Abspalten aller Schutzgruppen und des Trägers durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose bei pH 7,5 und 3,5 isoliert und ihre Homogenität durch Mikroionenaustauschchromatographie an Li chrosorb überprüft. Die Struktur wurde durch Sequenzanalyse nach Maxam und Gilbert<sup>15</sup> bestätigt.

<u>Tab. 2</u>	Polymermenge (mg)	isoliertes Oligonucleotid (OE <sub>260</sub> )	isoliertes Oligonucleotid ( $\mu$ mol)	Ausbeute (%)
1. d(TTGAATTCTC)	25	25,0	0,250	8,7
2. d(TTGAATTCAA)	19	13,0	0,113	5,2
3. d(GCATTGATCA)	13	2,5	0,023	1,8
4. d(CCTGGAATTTp)	18	8,0	0,078	4,8
5. d(CCAGGAGCTp)	29	21,5	0,225	8,2

Mit der von uns entwickelten Festphasensynthese an Polystyren-Teflon nach der Triestermethode in 5'-3' Richtung können Oligonucleotide mit oder ohne 3'-Phosphat in guten Ausbeuten und einfach zu handhabender Technik synthetisiert werden. Außerdem ist diese Methode für automatisierte Synthesen gut geeignet.

#### Literatur

- M.D. Matteucci und M.H. Caruthers (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185; F. Chow, T. Kempe und G. Palm (1981) Nucleic Acids Res. 9, 2807; T. Tanaka und R. Letsinger (1982) *ibid.* 10, 3249.
- M.J. Gait et al. (1980) *ibid.* 8, 1081; A.F. Markham et al. *ibid.* 5193; M.L. Duckworth et al. (1981) *ibid.* 9, 1691.
- K. Miyoshi et al. (1980) *ibid.* 8, 5473; *ibid.* 5491; P. Dembeck, K. Miyoshi und K. Itakura (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 706; E. Ohtsuka, H. Takashima und M. Ikehara (1981) Tetrahedron Lett. 22, 765.
- R. Crea und T. Horn (1980) Nucleic Acids Res. 8, 2331.
- G.R. Gough, M.J. Brunden und P.T. Gilham (1981) Tetrahedron Lett. 22, 4177.
- K. Miyoshi et al. (1980) Nucleic Acids Res. 8, 5507; H. Ito et al. (1982) *ibid.* 10, 1755; V.N. Dobrynin, B.K. Tschernov und M.N. Kolosov (1980) Bioorg. Khim. 6, 138; A.N. Sinyakov et al. (1982) *ibid.* 8, 490; E. Ohtsuka, H. Takashima und M. Ikehara (1982) Tetrahedron Lett. 23, 3081.
- V.K. Potapov et al. (1981) Dokl. Akad. Nauk SSSR 260, 240 (a); N.V. Amirkhanov et al. (1982) Bioorg. Khim. 8, 126; N.V. Amirkhanov, M.I. Kivkin und V.P. Kumarev *ibid.* 1008.
- M.J. Gait et al. (1982) J. Chem. Soc. Chem. Commun. 37.
- Potapov et al. (1978) Dokl. Akad. Nauk SSSR 241, 1352; Potapov et al. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 2041.
- L. Alder, A. Rosenthal und D. Cech, in Vorbereitung.
- L. Alder, A. Rosenthal, D. Cech und V.P. Veiko (1982) Z. Chem. 22, 266; A. Rosenthal et al. Z. Chem., im Druck.
- A.K. Seth und E. Jay (1980) Nucleic Acids Res. 8, 5445.
- V.A. Efimov, S.V. Reverdatto und O.G. Chakhnakhcheva (1982) Tetrahedron Lett. 23, 961.
- B=dT, dbzA, dbzC und dbzG, (P) = Copolymer Polystyren-Teflon, n=1 oder 2, R=o- oder p-ClPh-, KA=Kondensationsmittel, CE=2-Cyanoethyl-, Bz oder bz= Benzoyl-, Np=Np(o- oder p-ClPhO-), Np=Np(o- oder p-ClPhO-,CE-), TFA=Tri-fluoressigsäure, Ausbeuten (Tab. 2) wurden in bezug auf das erste am Träger gebundene Nucleotid ermittelt, — bezeichnet verwendete Dinucleotidblöcke.
- A.M. Maxam und W. Gilbert (1980) Methods in Enzymol. 65, 499.