

Bausteine für Oligonucleotid-Synthesen mit einheitlich fragmentierbaren β -halogenierten Schutzgruppen

Building Blocks for Oligonucleotide Syntheses with Uniformly Fragmentable β -Halogenated Protecting Groups

Peter Lemmen, Rosmarie Karl und Ivar Ugi

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität München,
Lichtenbergstraße 4, D-8046 Garching

und

Neil Balgobin und Jyoti Chattopadhyaya

Departement of Bioorganic Chemistry, University of Uppsala Biomedical Center,
Box 581, S-75123 Uppsala, Sweden

Z. Naturforsch. **42c**, 442–445 (1987); received September 26, 1986

Herrn Professor Helmut Simon zum 60. Geburtstag gewidmet

DNA-Synthesis, Phosphite Triester, Protective Groups, Guanine-Protection

5'-Dimethoxytrityl-3'-phosphite amides of deoxynucleosides are synthesized. Phosphite/phosphate is protected by the 2,2,2-trichloro-1,1-dimethyl-ethyl (TCB) group, heterocyclic bases by the 2,2,2-trichloro-2,2-dimethyl-ethoxycarbonyl (TCBOC) group. Deoxyguanosine is also blocked by 6-O-trichloroethyl thus avoiding the difficulties observed with monoprotected guanine residues.

Einleitung

Die „Phosphitmethode“ zur Darstellung von Oligonucleotiden [1] hat mit der Verwendung von Phosphitamidin [2] als reaktiven Synthonen eine weite Verbreitung gefunden. Der Wunsch nach stabileren und einfacher zu handhabenden Phosphitamidin und nach spezifischeren Abspaltbedingungen der Phosphatschutzgruppen hat eine Reihe von Arbeitskreisen zu Modifikationen der Phosphitamid-Reagentien angeregt [3–6]. In unserem Arbeitskreis erproben wir die durch reduktive Fragmentierung selektiv abspaltbare 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethyl-ethoxygruppe (TCB) als Phosphatschutz [7].

Daneben haben wir die ebenfalls durch reduktive Fragmentierung selektiv abspaltbare 2,2,2-Trichlor-1,1-dimethyl-ethoxycarbonylgruppe (TCBOC) zum Schutz der heterocyclischen Basen verwendet [8].

Die Notwendigkeit, Guanosin zusätzlich zum 2-N-Schutz weiter zu blockieren, ist in den letzten Jahren sehr deutlich geworden. Hierfür hat sich 6-O-Schutz bisher am besten bewährt [9–11].

In der vorliegenden Arbeit werden Synthesen von Nucleosid-Synthesebausteinen für eine einheitliche Schutzgruppenstrategie beschrieben; alle Schutz-

gruppen sind durch reduktive Fragmentierung mittels Co-I-Phthalocyanin [7a] abspaltbar.

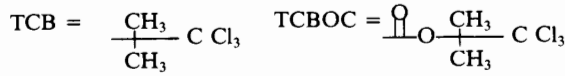
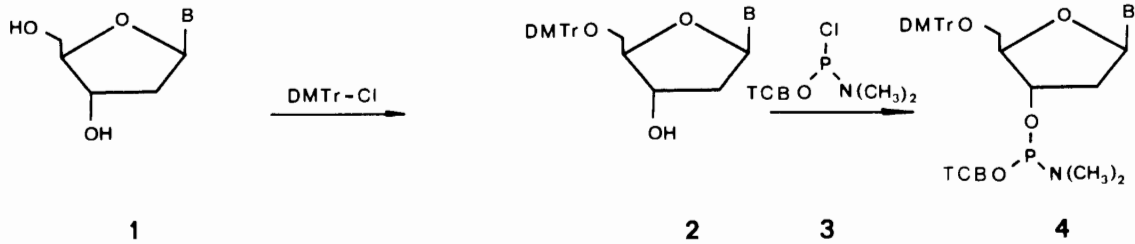
Ergebnisse und Diskussion

Thymidin und die N-TCBOC-geschützten Derivate von Desoxycytidin, -adenosin und -guanosin **1a–d** [8] werden in Analogie zu anderen geschützten Nucleosiden mittels Dimethoxytritylchlorid in die 5'-Dimethoxytritylderivate **2a–d** überführt. Die Bildung von **2a–c** verläuft komplikationslos und in guten Ausbeuten. Im Falle des 2-N-TCBOC-Desoxyguanosins (**1d**) erhält man niedrigere Ausbeuten an **2d** und kann bei vorsichtigem Aufarbeiten instabile Produkte erhalten, die lt. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum das 8-H-Atom des Guanins nicht mehr enthalten. Diese Tendenz wird im Falle des N-1-2-N-Bis-TCBOC-desoxyguanosins **1e** verstärkt beobachtet.

Die Phosphorylierung von **2a–c** mittels Phosphorigsäure-2,2,2-trichlor-1,1-dimethylethylester-dimethylamid-chlorid (**3**) [7b] ergibt gute Ausbeuten. Die Produkte werden durch schnelle Kurzsäulen-chromatographie [4] gereinigt und mit Hexan gefällt. Lt. $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum lassen sich die Phosphitamide **4a–c** in guter Reinheit erhalten. Aus dem Desoxyguanosinderivat **2d** erhält man so **4d** in nur 20% Ausbeute neben sehr zersetzlichen, noch nicht näher charakterisierten Nebenprodukten.

Sonderdruckanforderungen an Dr. P. Lemmen.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/87/0400–0442 \$ 01.30/0

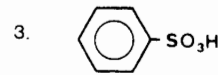
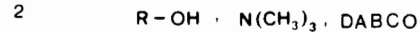
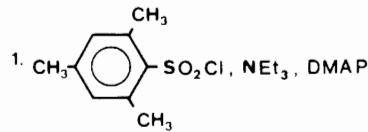
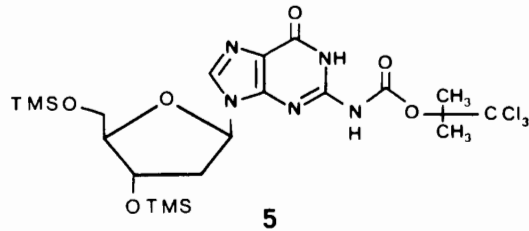


- a B = 1-thyminylnyl-
- b 4-N-TCBOC-1-cytosinylnyl-
- c 6-N-TCBOC-9-adeninylnyl-
- d 2-N-TCBOC-9-guaninylnyl-
- e N-1-2-N-bis-TCBOC-9-guaninylnyl-

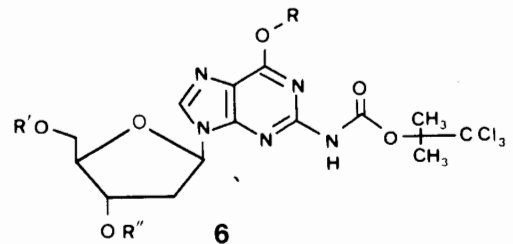
Zur Vermeidung dieser Schwierigkeiten wurden 6-O-geschützte Desoxyguanosinderivate hergestellt. Desoxyguanosin wird in einer Eintopfreaktion nach intermediärer Silylierung mittels TCBOC-Cl an 2-N acyliert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels Pyridin und Lösen in Methylenchlorid übersteht das

3',5'-Bistrimethylsilyl-2-N-TCBOC-desoxyguanosin (5) eine vorsichtige wäßrige Aufarbeitung und schnelle Chromatographie.

In Analogie zu Jones' Verfahren [11] läßt sich 5 an 6-O alkylieren:



6 a b



	R	R'	R''
a	TCE	H	H
b	oNP	H	H
c	TCE	Ac	Ac
d	oNP	Ac	Ac
e	H ^a	Ac	Ac
f	TCE	DMTr	H
g	TCE	DMTr	P(NMe ₂)OTCB

^a Tautomer, TCE: Trichloretyl, oNP: *o*-Nitrophenyl, Ac: Acetyl, DMTr: 4,4'-Dimethoxytrityl.

Durch Mesitylsulfoclorid/Triethylamin/DMAP wird **5** in den 6-O-Sulfonsäureester überführt. Nach Umsetzen mit Trimethylamin wird die Schutzgruppe unter DABCO-Katalyse mittels Trichlorethanol bzw. *o*-Nitrophenol eingeführt. Die 3'- und 5'-Silylgruppen werden abschließend durch vorsichtige saure Hydrolyse entfernt.

Kurzsäulenchromatographie ergibt 2-N-TCBOC-6-trichlorethyl- bzw. 2-N-TCBOC-6-*o*-nitrophenyl-desoxyguanosin (**6a** bzw. **6b**) in 40% Ausbeute (bezogen auf Desoxyguanosin).

Der stabilisierende Einfluß des 6-O-Schutzes läßt sich an den 3',5'-Diacetaten **6e** und **6c** und **6d** zeigen. Im Gegensatz zu 3'-5'-Diacetyl-N-2-TCBOC-desoxyguanosin (**6e**) sind die O-6-geschützten **6c** und **6d** gegen Acetanhydrid völlig stabil (DC). Reaktion mit Phosphorigsäure-2,2,2-trichlor-1,1-dimethylethylester-dimethylamid-chlorid (**3**), das **6e** und **2d** zu einem großen Teil zerstört, findet bei **6c** und **d** nur noch in Spuren statt. Gegen Phosphorigsäurediester-dimethylamid/Tetrazol sind sie völlig inert.

So gelingen auch die Überführung in das 5'-Dimethoxytritylderivat **6f** und das Phosphitamid **6g** beim 6-O-geschützten Desoxyguanosinderivat ohne die bei **1d** und **1e** beobachteten Nebenprodukte.

Bei der Tritylierung von **1d** und **1e** bilden sich lt. ¹H-NMR Produkte, die die 8-CH-Gruppe nicht enthalten. Dies deutet auf eine Hydrolyse des Imidazolringes nach Tritylierung an N-7 hin. Die entsprechenden Zwischenstufen konnten im Fall der Phosphorylierung mittels 2-Chlorphenyl-phosphorsäurebis-1,2,4-triazolid isoliert werden [12]. Die Beobachtung, daß O-6-Schutz den Guaninrest stabilisiert, während N-1-Acylierung ihn labil macht, wurde in jüngster Zeit auch anhand der N-7-¹⁵N-NMR-Daten von Guanosiderivaten nachgewiesen [13].

Mit den hier beschriebenen Nucleosidderivaten sind Synthesebausteine für die Oligonucleotidsynthese zugänglich, deren Schutzgruppen in einem einzigen Deblockierungsschritt gemeinsam durch reduktive Fragmentierung abspaltbar sind.

Die Erprobung dieser Synthesebausteine bei Oligonucleotidsynthesen ist noch nicht abgeschlossen.

Dank

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 145, Biologische, Chemische und Technische Grundlagen der Biokonversion) für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Experimentelles

Alle Reaktionen wurden in getrockneten Lösungsmitteln unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. ¹H-NMR-Spektren (CDCl₃, TMS interner Standard) wurden bei 200 MHz an einem Bruker WP200, ³¹P-NMR-Spektren im gleichen Lösungsmittel (H₃PO₄ externer Standard) an einem Jeol FX 90Q oder Bruker HX90-Spektrometer gemessen. Kurzsäulenchromatografie erfolgte an TLC-Kieselgel 60H, 15 µm, der Fa. Merck.

Die 5'-Dimethoxytrityl-N-TCBOC-geschützten Nucleoside **2a-d** wurden in Analogie zu [7] zu den Phosphitamiden **4a-d** in 90, 70, 70 und 20% Ausbeute phosphoryliert. Die ³¹P-NMR Spektren zeigen die Signale der Diastereomeren bei 140,17 und 140,35 (**4a**), 140,41 und 140,90 (**4b**), 139,92 und 140,96 (**4c**) und bei 139,76 und 140,72 (**4d**).

2-N-(2,2,2-Trichlor-1,1-dimethyl-ethoxycarbonyl)-3',5'-bistrimethylsilyl-2'-desoxyguanosin (**5**)

1,43 g (5 mmol) Desoxyguanosin werden nach zweimaligem Lösen in je 10 ml Pyridin und Abdestillieren im Vakuum in 50 ml Pyridin gelöst und mit 4,5 ml (33 mmol) Trimethylchlorsilan versetzt. Nach 3 h ist lt. DC (Kieselgel, CHCl₃/EtOH 7:3, R_f = 0,71) die Silylierung vollständig. Nach Zugabe von 1,2 g (5 mmol) TCBOC-Cl wird über Nacht gerührt. Das Pyridin wird in vacuo abdestilliert, der Rückstand in Toluol aufgenommen und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird nun in Methylenchlorid aufgenommen und mit eiskalter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Man erhält in praktisch quantitativer Ausbeute (3,0 g) ein lt. DC (CHCl₃/EtOH 9:1, R_f = 0,57) fast einheitliches Öl. Zur Charakterisierung kann es nach Kurzsäulenchromatografie im gleichen Laufmittel mit 50% Ausbeute rein erhalten werden.

¹H-NMR: δ = 7,94 (s; 1H, 8-H), 7,91 (br.; 1H, NH), 6,19 (t, J = 6,3 Hz; 1H, 1'-H), 4,45 (m; 1H, 3'-H), 3,92 (m; 1H, 4'-H), 3,65 (m; 2H, 5'-H), 2,3 (m; 2H, 2'-H), 1,93 (s; 6H, TCBOC), 0,08, 0,07 (2s; je 9H, SiCH₃).

2-N-(2,2,2-Trichlor-1,1-dimethyl-ethoxycarbonyl)-6-O-*o*-nitrophenyl-2'-desoxyguanosin (**6a**) und 2-N-(2,2,2-Trichlor-1,1-dimethyl-ethoxycarbonyl)-6-O-(2,2,2-trichlorethyl)-2'-desoxyguanosin (**6b**)

1,69 g (2,80 mmol) **5** werden in 40 ml Methylenchlorid gelöst und mit 1,95 ml (13,7 mmol) Triethyl-

amin, 3,0 g (13,7 mmol) Mesitylensulfochlorid und 67 mg (0,50 mmol) Dimethylaminopyridin versetzt. Nach 50 min Rühren wird mit conc. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet, eingeeignet, in 40 ml Methylenchlorid gelöst und mit 4,0 ml Trichlorethanol bzw. 5,7 g *o*-Nitrophenol (41 mmol) versetzt. Bei 0 °C werden 3 ml Trimethylamin und nach 10 min 0,50 g (4,1 mmol) DABCO zugesetzt. Nach 25 min wird mit Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt und mehrfach mit Methylenchlorid extrahiert. Nach Trocknen und Abdestillieren des Lösungsmittels wird mehrfach in Toluol gelöst und abgedampft.

Der Rückstand wird in 40 ml einer Toluolsulfonsäurelösung (0,1 m in Methylenchlorid/Methanol 7:3)

gelöst und nach 1 min mit conc. Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert.

Kurzsäulenchromatografie (CHCl₃/EtOH 9:1) und Fällung in Hexan ergeben 0,60 g (36%) **6a** bzw. 0,68 g (40%) **6b**.

¹H-NMR: **6a**: δ = 7,98 (s; 1H, 8-H), 7,56 (br.; 1H, NH), 6,34 (dd; 1H, 1'-H), 5,29 (s; 2H, CH₂CCl₃), 4,95 (m; 1H, 3'-H), 4,17 (m; 1H, 4'-H), 3,95 (m; 2H, 5'-H), 3,02, 2,40 (2 m; 2H, 2'-H), 2,03, 2,02 (2s; je 3H, TCBOC).

6b: δ = 8,03 (s; 1H, 8-H), 8,20, 7,75, 7,45 (3 m; 4H, Ar.), 7,34 (br.; 1H, NH), 6,36 (dd; 1H, 1'-H), 5,00 (m; 1H, 3'-H), 4,15 (m; 1H, 4'-H), 3,9 (m; 2H, 5'-H), 3,08, 2,45 (2 m; 2H, 2'-H), 1,97, 1,96 (2s; je 3H, TCBOC).

- [1] R. L. Letsinger und W. B. Lunsford, *J. Am. chem. Soc.* **98**, 3655 (1976).
- [2] S. L. Beaucage und M. H. Caruthers, *Tetr. Lett.* **22**, 1859 (1981).
- [3] N. D. Sinha, J. Biernat, J. McManus und H. Köster, *Nuc. Acids. Res.* **12**, 4539 (1984).
- [4] T. Dörper und E. L. Winnacker, *Nuc. Ac. Res.* **11**, 2575 (1983).
- [5] R. L. Letsinger, E. P. Groody und T. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6805 (1982).
- [6] N. Balgobin und J. Chattopadhyaya, *Acta Chem. Scand.* **B 39**, 883 (1985).
- [7a] H. A. Kellner, R. G. Schneiderwind, H. Eckert und I. Ugi, *Angew. Chem.* **93**, 581 (1981).
- [7b] G. Hering, R. Stöcklein-Schneiderwind, I. Ugi, T. Pathak, N. Balgobin und J. Chattopadhyaya, *Nucleosides and Nucleotides* **4**, 169 (1985).
- [8] X. X. Zhou, I. Ugi und J. Chattopadhyaya, *Act. Chem. Scand.* **B 39**, 761 (1985).
- [9] S. S. Jones, C. B. Reese, S. Sibanda und A. Ubasawa, *Tetr. Lett.* **22**, 4755 (1981).
- [10] H. P. Daskalov, M. Sekine und T. Hata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **54**, 3076 (1981).
- [11] B. L. Gaffney und R. A. Jones, *Tetr. Lett.* **23**, 2253 (1982).
- [12] X. X. Zhou, A. Sandström und J. Chattopadhyaya, *Chemica Scripta* **26**, 241 (1986).
- [13] G. Remaud, X. X. Zhou, C. J. Welch und J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron* **42**, 4057 (1986).