

8. SYNTHESE EINES O⁴-GESCHÜTZTEN 6-PHENYL-ISOXANTHOPTERIN-N⁸-NUCLEOSIDS

Entsprechend den Syntheserouten aus Kapitel 3 wurden die bei den 6-H-substituierten Pteridin-Nucleosiden erfolgreichen Methoden (vgl.Kap.7) auf die 6-phenylsubstituierten Nucleoside **80**, **86** und **87** übertragen. Das Ziel war die Darstellung eines O⁴-NPE-geschützten OH-freien 6-Phenylisoxanthopterin-Nucleosids als Ausgangsmaterial zur Synthese des Phosphitamidbausteins **4**.

8.1. Die 6-Phenyl-Isoxanthopterin-Route

8.1.1. Abspaltung der O⁴-Benzyl-Schutzgruppe

Der erste Schritt bei den beiden aminosubstituierten 6-Phenylisoxanthopterin-Derivaten **86** und **87** war die Abspaltung der Schutzgruppe an der O⁴-Position.

Das 2-Amino-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**86**) konnte hydrogenolytisch unter Palladium-Katalyse in CH₂Cl₂/MeOH (2:1) in einer Ausbeute von 96% zum 2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**116**) debenzyliert werden (Abb.8.1).

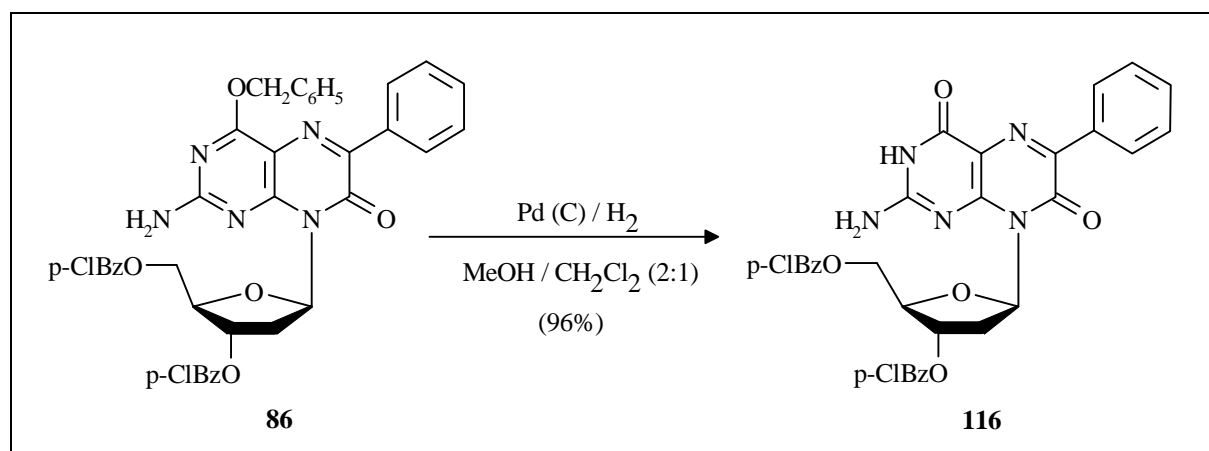


Abb.8.1 : hydrogenolytische Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe bei **86**

Verbindung **116** erwies sich, wie schon das entsprechende am Aglycon entschützte 6-H-substituierte Pteridin-Nucleosid **89**, als schwerlöslich in CH₂Cl₂/MeOH und zeigte Tendenzen zur Koagulation. Die Abtrennung vom Katalysator konnte folglich nicht durch einen einfachen Filtrationsschritt erfolgen. Daher wurde **116** aus dem Rohprodukt der Synthese über eine Soxhlet-Extraktion isoliert, wobei es in Form feiner gelber Nadeln kristallin in 96% erhalten wurde.

Die Darstellung von 2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**116**) gelang auch ausgehend vom 2-N,N-Dimethylamino-methylenamino-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-6-phe-

nyl-7(8H)-pteridinon (**87**). Die dmf-Schutzgruppe erwies sich bei ersten Debenzylierungsversuchen an **87** in CH₂Cl₂/MeOH als nicht stabil. Daher wurde dieses Nucleosid zur Entschützung der Aminofunktion vor der Hydrogenolyse für 10 min mit methanolischem Ammoniak behandelt. Anschließend erfolgte analog der zuvor beschriebenen Prozedur die Debenzylierung mit H₂/Pd in CH₂Cl₂/MeOH (Abb.8.2). Über beide Stufe ließ sich so ausgehend von **87** das am Aglycon entschlützte Nucleosid **116** in einer Ausbeute von 74% erhalten.

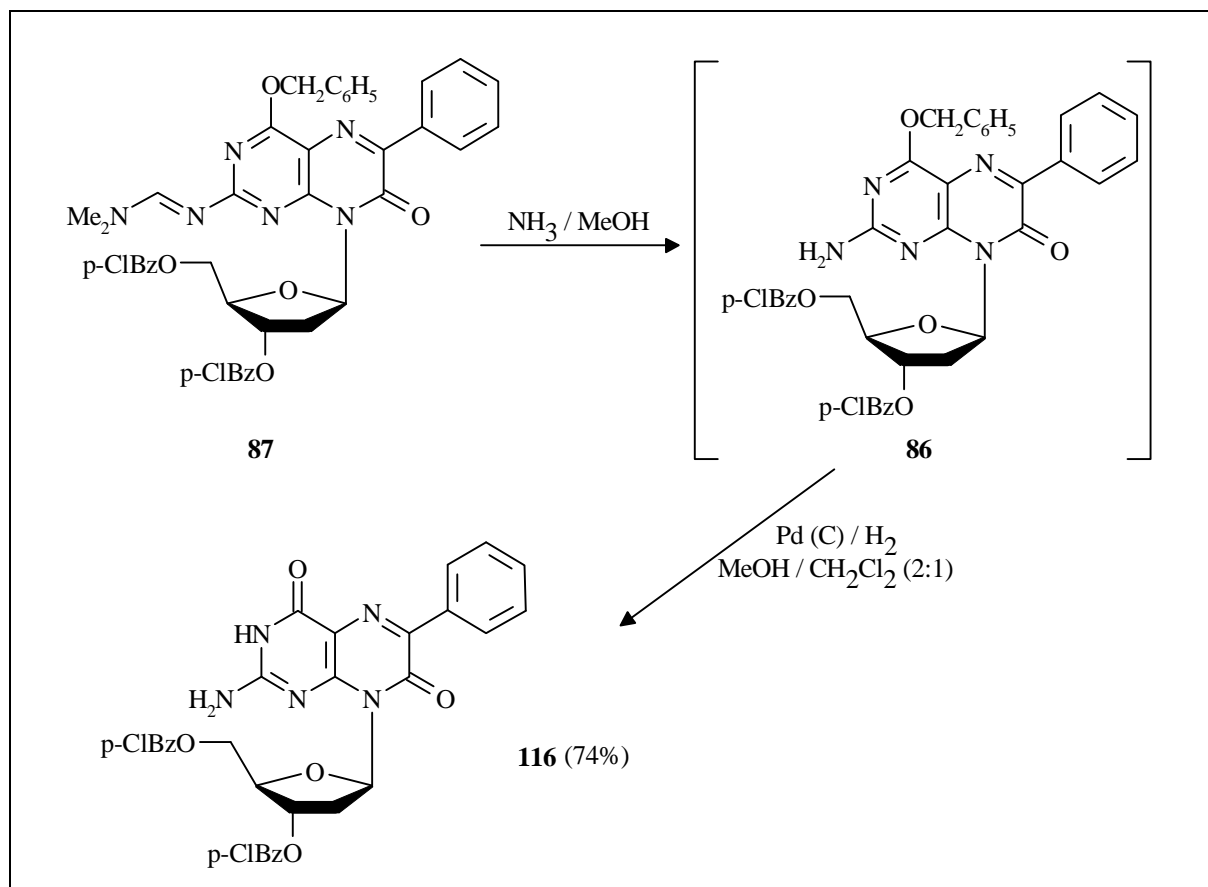


Abb.8.2 : zweistufige Entschützung von **87** zu **116**

Die zusätzliche Blockierung der 2-Aminofunktion des Isoxanthopterin-Derivats **9** durch die dmf-Schutzgruppe zum 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**60**) bringt also weder bei der Glycosidierung (vgl.Kap.5) noch bei dieser Entschützungs-Stufe Vorteile gegenüber der Verwendung der nicht modifizierten Verbindung **9**.

8.1.2. Einführung der NPE-Gruppe in die O⁴-Position von **116**

Die Blockierung der O⁴-Position von **116** mit der 2-(4-Nitrophenyl)ethyl-Gruppe wurde wiederum über eine Mitsunobu-Reaktion^[315] durchgeführt. Die Umsetzung des Nucleosids mit

jeweils 1,25 Äquivalenten 2-(4-Nitrophenyl)ethanol, Triphenylphosphin und Azodicarbonsäure-diisopropylester führte dabei nach chromatographischer Aufarbeitung zum 2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**117**) in einer Ausbeute von 86%.

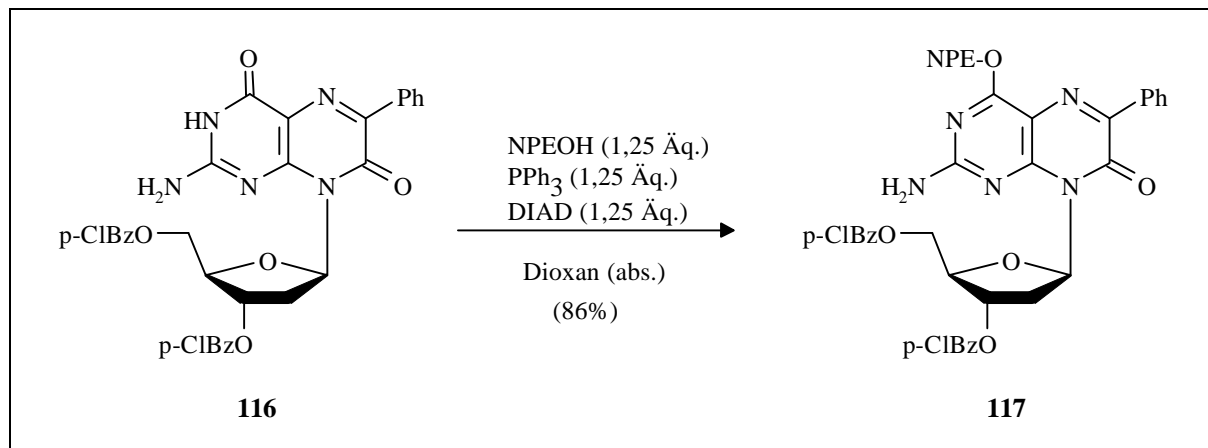


Abb.8.3 : Einführung der NPE-Gruppe über eine Mitsunobu-Reaktion^[315] in **116**

8.1.3. Abspaltung der Zuckerschutzgruppen

Beim analogen 6-H-substituierten Nucleosid **113** gelang die Entschützung des Zuckers mit Natriumcyanid in Methanol. Dieses Verfahren ließ sich auf das 2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**117**) übertragen. So konnte durch Behandlung von **117** mit einem Überschuß von Natriumcyanid in Methanol das 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**118**) in einer Ausbeute von 71% gewonnen werden (Abb.8.4).

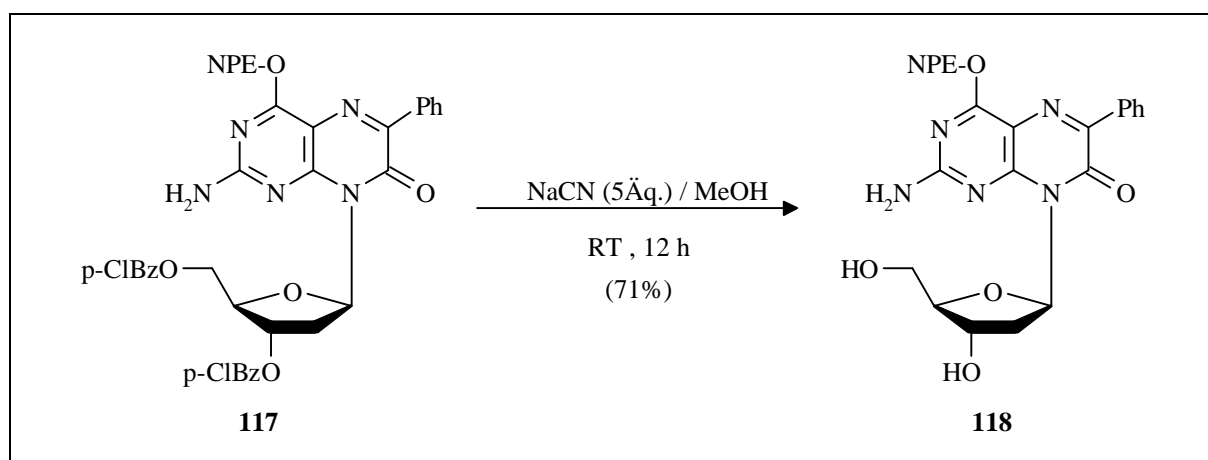


Abb.8.4 : Abspaltung der Zuckerschutzgruppen von **117** mit NaCN/MeOH, Synthese des 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinons (**118**)

Das Nucleosid **118** stellt ein zur Synthese des Phosphitamid-Bausteines **4** geeignetes Ausgangsmaterial dar.

8.2. DIE 2-METHYLMERCAPTO-6-PHENYL-ISOXANTHOPTERIN-ROUTE

Für eine weitere Zugangsmöglichkeit zum O⁴-NPE-geschützten 6-Phenyl-Isoxanthopterin-Nucleosid **118** wurden die Arbeiten an den 6-H-substituierten 2-Methylmercapto-Derivaten auf die 6-phenylsubstituierte Verbindung **80** übertragen.

8.2.1. Einführung der NPE-Gruppe

An erster Stelle dieses Syntheseweges stand wiederum die Blockierung der O⁴-Position über eine Mitsunobu-Reaktion^[315]. Die Umsetzung des N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindions (**80**) mit jeweils 1,25 Äquivalenten Triphenylphosphin, 2-(4-Nitrophenyl)ethanol und Azodicarbonyldiisopropylester führte nach chromatographischer Aufarbeitung glatt in 86% zum N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**119**).

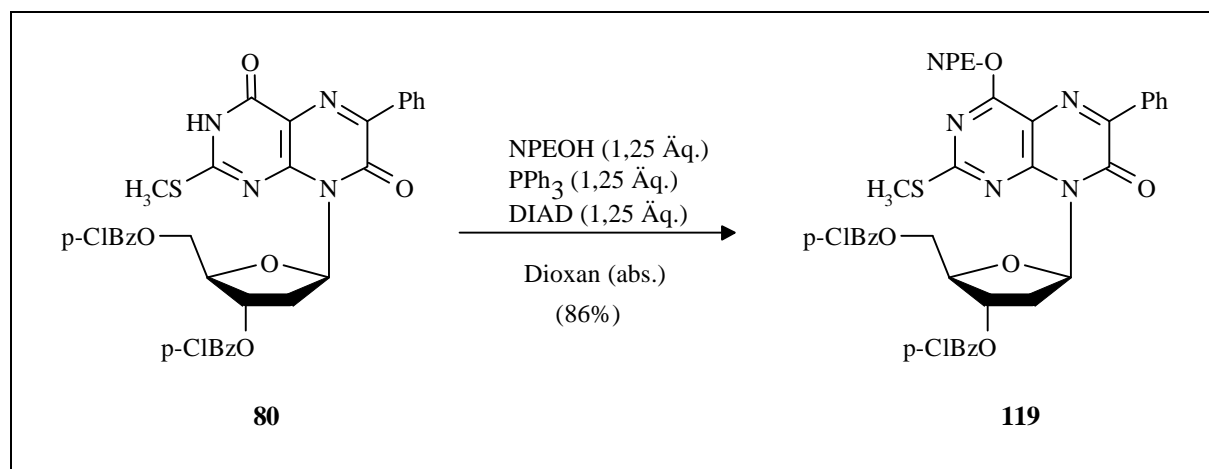


Abb.8.5 : Einführung der NPE-Gruppe in **80**

8.2.2. Die Oxidation der Methylmercaptogruppe

Ausgehend vom N⁸-[2-Desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-6-methyl-2-methylmercapto-4-(4-nitrophenyl)ethoxy-7(8H)-pteridinon (**120**) gelang es Melguizo^[104,154] durch Oxidation mit m-CPBA das N⁸-[2-Desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-6-methyl-2-methylsulfonyl-4-(4-nitrophenyl)ethoxy-7(8H)-pteridinon (**111**) darzustellen (Abb.8.6).

Bei 6-alkyl- oder arylsubstituierten Pteridinen ist eine kovalente Hydratation am Pyrazinring aus sterischen Gründen nicht möglich, weshalb die bei den 6-H-substituierten Derivaten auftretende Nebenreaktion (Folgeoxidation in Position 6) nicht stattfinden kann.

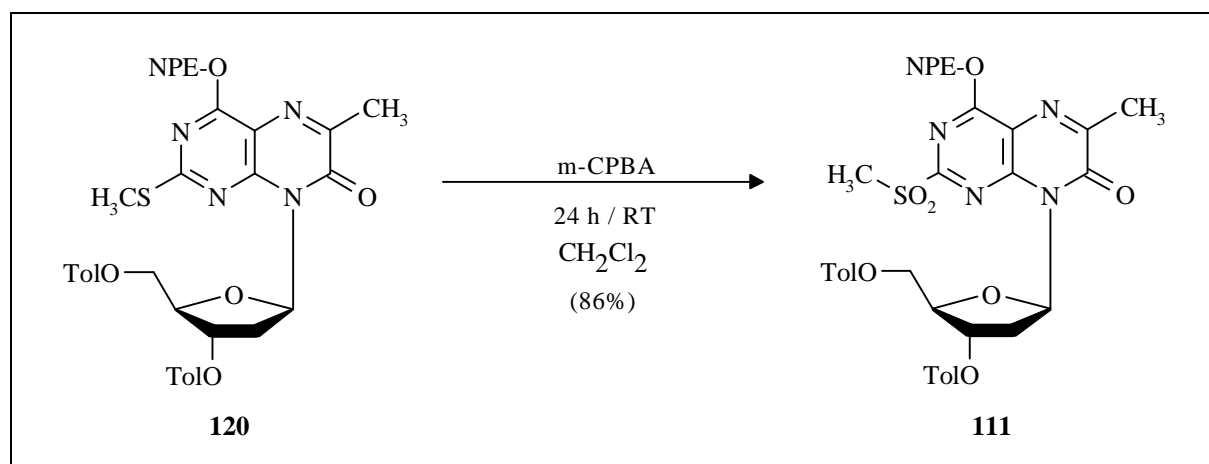


Abb.8.6 : Darstellung des N⁸-[2-Desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-6-methyl-2-methylsulfonyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinons (**111**) durch Melguizo^[104,154]

Daher konnte zur Oxidation des N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinons (**119**) statt des Dimethyldioxirans (**106**) auch die m-Chlorperbenzoesäure verwendet werden.

Die Umsetzung von **119** mit m-CPBA in Methylenchlorid (Abb.8.7) führte in 18h bei einer Ausbeute von 85% nach chromatographischer Reinigung zum N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylsulfonyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**121**).

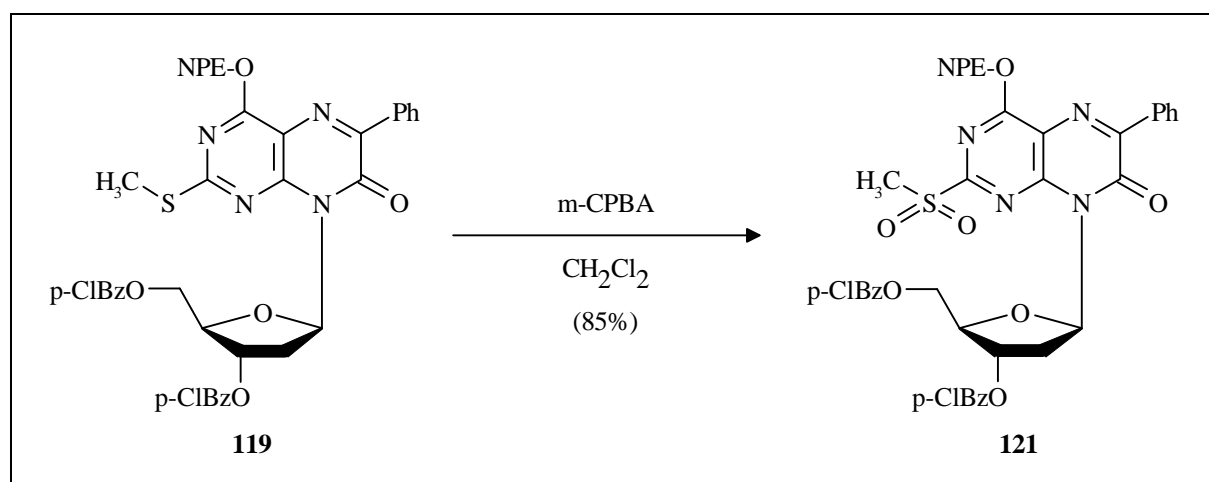


Abb.8.7 : Synthese von **121** durch Oxidation der 2-Methylmercaptofunktion in **119** mit m-CPBA

8.2.3. Austausch des 2-Methylsulfonylsubstituenten

Melguizo^[104,154] führte durch Substitution mit gasförmigem Ammoniak in CH₂Cl₂ am 6-Methyl-Analogon, dem N⁸-[2-Desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-6-methyl-2-methylsulfonyl-4-(4-nitrophenyl)ethoxy-7-(8H)-pteridinon (**111**), die Aminofunktion in das Molekül ein und gelangte so zum geschützten 6-Methyl-Isoxanthopterin-Nucleosid **112** (vgl. Abb.7.17). Wie schon bei der Synthese des 6-H-Analogons **110** konnte diese Methode ohne Variationen auf das N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylsulfonyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridinon (**121**) übertragen werden. Dabei gelang die Darstellung des bereits nach der 6-Phenylisoxanthopterin-Route (Kap.8.1) gewonnenen 2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)-ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinons (**117**) in einer Ausbeute von 95 %.

Das erhaltene Produkt erwies sich in UV und ¹H-NMR identisch mit dem nach anderen Route (Kap.8.1) dargestellten **117**.

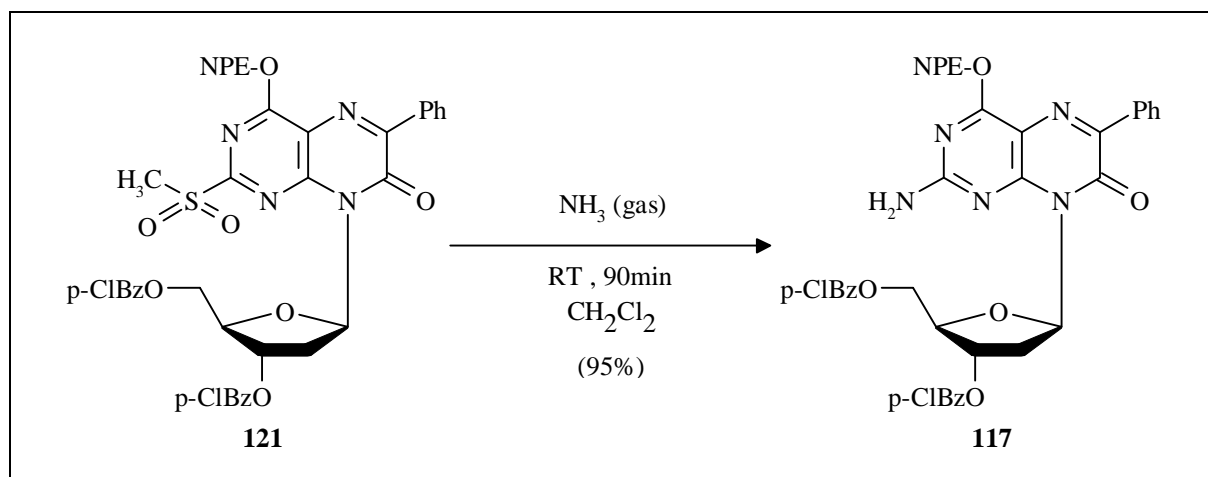


Abb.8.8: Austausch der Methylsulfonyl-Funktion in **121**

8.3. Spektroskopische Daten

8.3.1. UV-Absorptionsspektren

Zu den Änderungen in den UV-Spektren der Verbindungen **116-119** kann prinzipiell dasselbe ausgesagt werden, wie zu den 6-H-analogen Verbindungen in Kapitel 7. Aufgrund der Phenylsubstitution an der C(6)-Position findet sich die längstwellige Absorption allerdings um 30-40 nm gegenüber den 6-H-Derivaten bathochrom verschoben.

Nr.	λ_{\max} [nm]			log ϵ			LM/pH
116	202	242	359	4,62	4,52	4,06	MeOH
117	202	241	373	4,61	4,50	4,14	MeOH

118	211	248	373	4,59	4,22	4,29	MeOH		
119	203	221	242	364	4,65	4,46	4,55	3,90	MeOH

Tab.8.1 UV-Daten der Nucleoside **116-119** in MeOH

In Abb.8.9 und 8.10 sind daher als Beispiele die UV-Spektren der 6-Phenylpteridin-Nucleoside **118** und **119** in Methanol denen ihrer jeweiligen 6-H-substituierten Analoga **115** bzw. **100** gegenübergestellt.

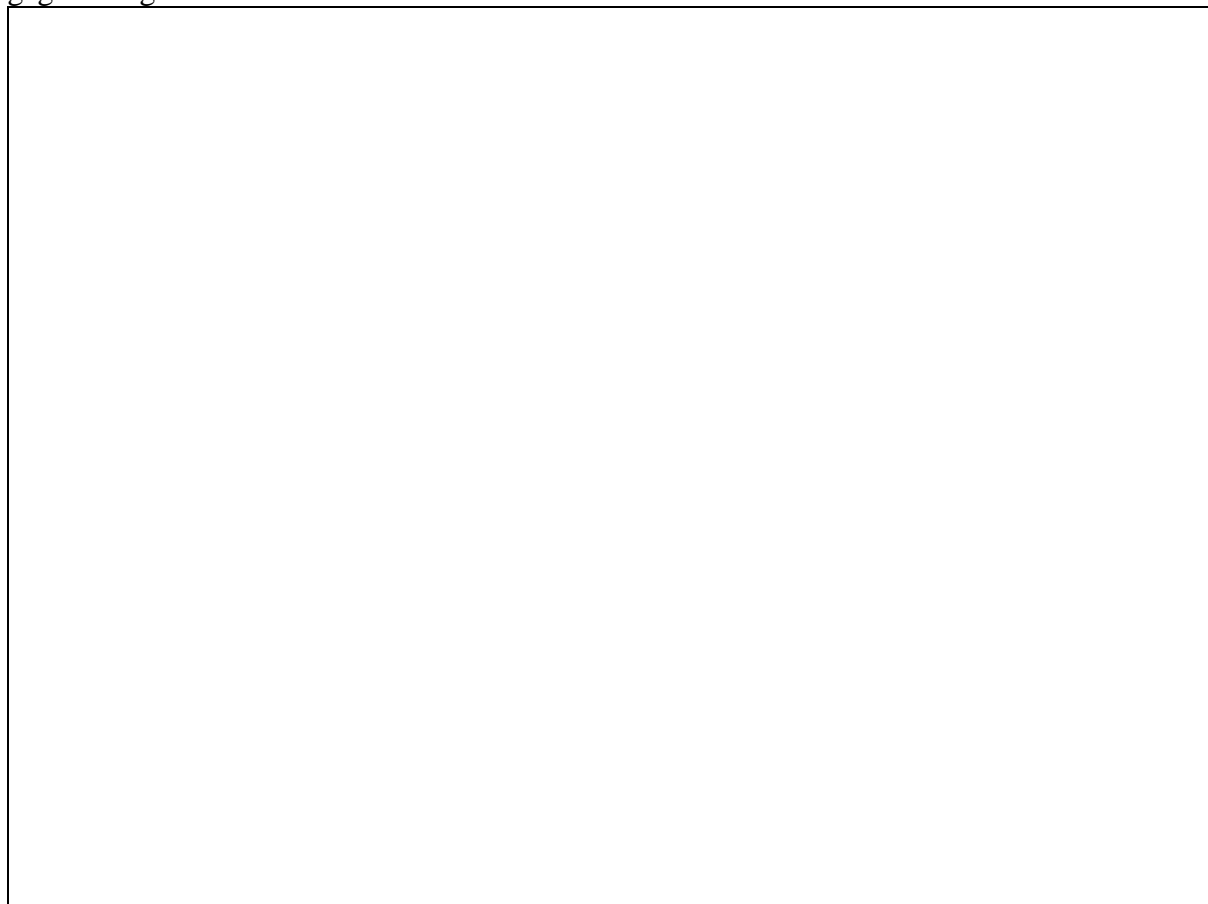


Abb.8.8 : UV-Spektren der Verbindungen **118** und **115** in Methanol

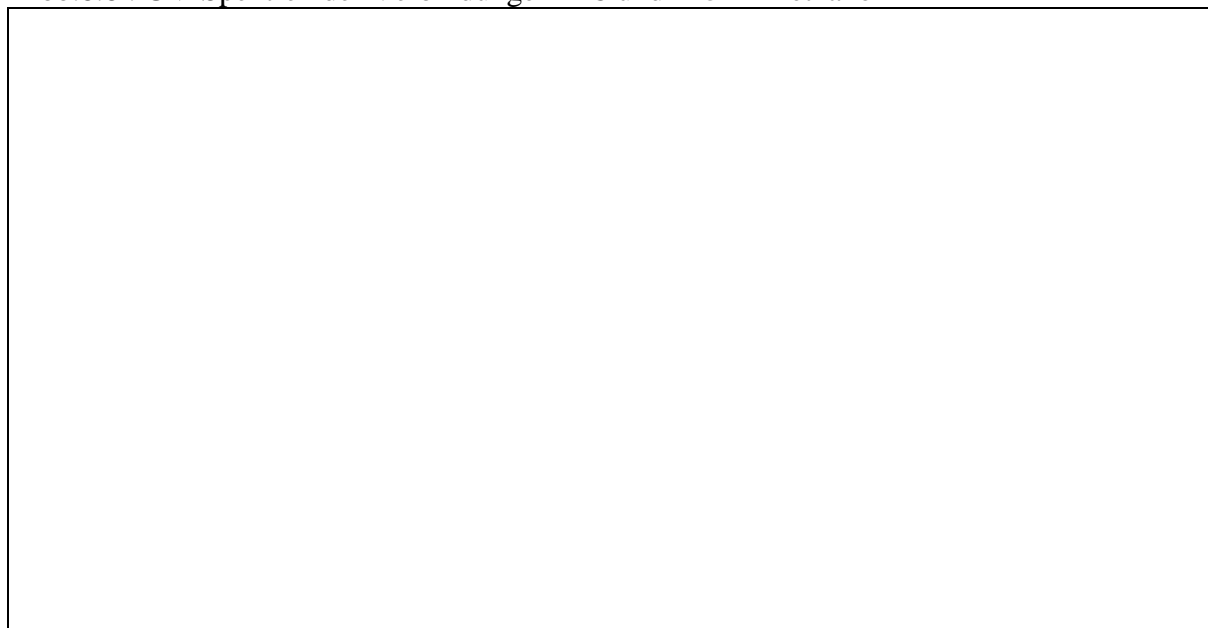




Abb.8.9 : UV-Spektren der Verbindungen **119** und **100** in Methanol

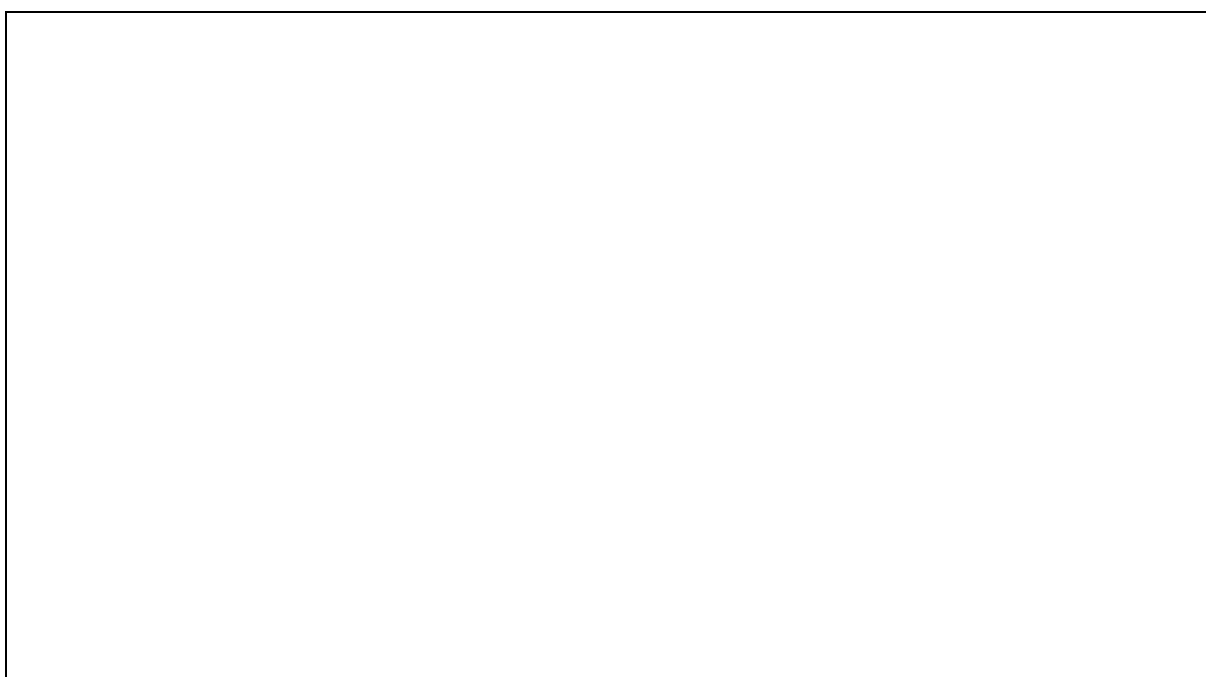
8.3.2. ¹H-NMR-Spektren

Auch bei den ¹H-NMR-Spektren der Verbindungen **116-119** und **121** ergeben sich im Vergleich zu den entsprechenden 6-H-substituierten Verbindungen keine unerwarteten Resultate.

Unterschiede ergeben sich lediglich durch den Phenyl-Substituenten an der C(6)-Position. Ansonsten finden sich die typischen Werte für die Resonanzen der Zuckerprotonen und die entsprechenden Protonensignale der Schutzgruppen an Aglycon und Zucker.

Bei dem am Zucker entschützten 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**118**) wurden auch für die beiden Hydroxylprotonen die erwarteten Signal-Lagen im ¹H-NMR gefunden.

Eine Zusammenstellung der ¹H-NMR-Daten ist in Tabelle 8.2 gegeben. Als Beispiele sind die Spektren der Verbindungen **117-119** in den Abbildungen 8.10-8.12 dargestellt.



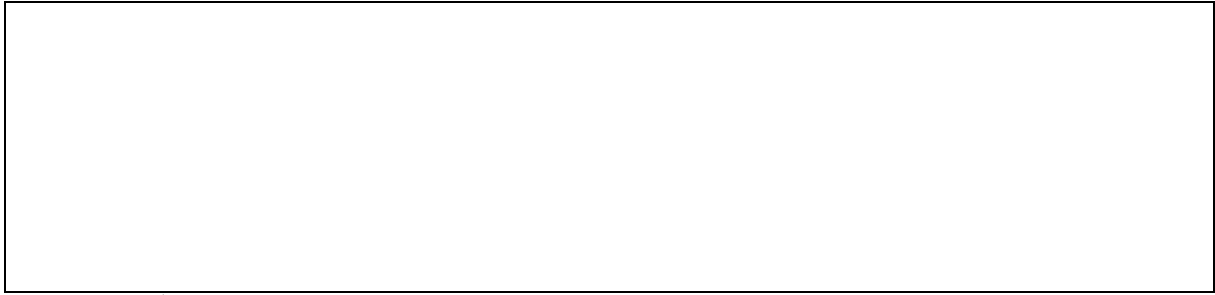
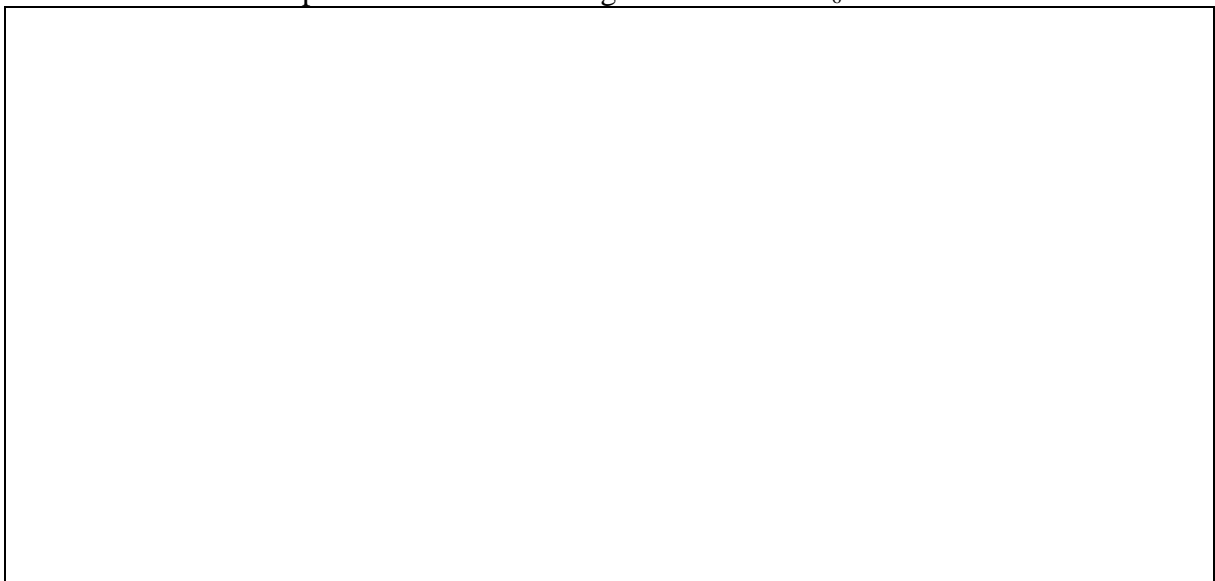


Abb.8.10 : ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **117** in CDCl₃



Abb.8.11 : ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **118** in DMSO-d₆



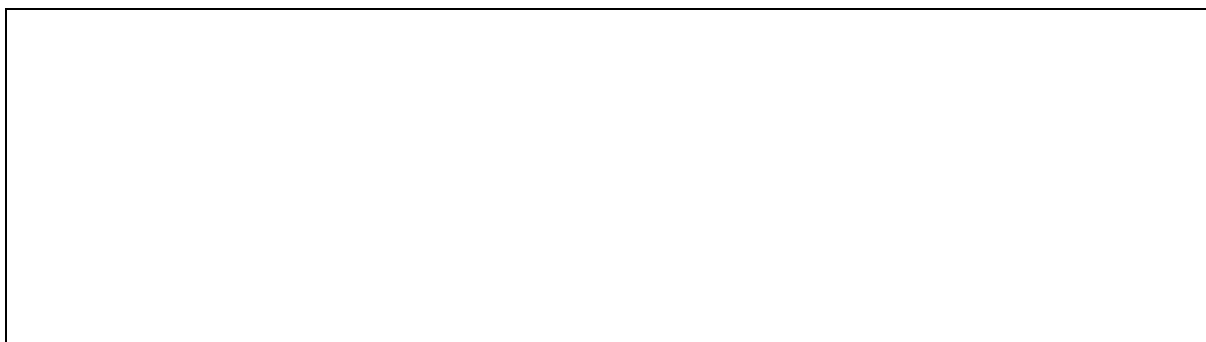


Abb.8.12: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **119** in CDCl_3

Nr.	Aglycon	Aglycon-Schutzgruppen	Zucker
116	12,9 ppm (H-(N ³)) 8,20-8,12 ppm (H _{Ar} (Phe)) 7,50-7,15 ppm (H _{Ar} (Phe), verd.) 5,39 ppm (2-NH ₂)		7,50-7,15 ppm (H-C(1'), verd.) 6,15-6,08 ppm (H-C(3')) 4,98 ppm (H-C(4')) 4,63-4,52 ppm (2 H-C(5')) 3,48-3,35 ppm (H _β -C(2')) 2,55-2,45 ppm (H _α -C(2'))
117	8,20-8,12 ppm (H _{Ar} (Phe), verd.) 7,55-7,23 ppm (H _{Ar} (Phe), verd.) 5,39 ppm (2-NH ₂)	8,20-8,12 ppm (H _{Ar} (NPE), verd.) 7,55-7,23 ppm (H _{Ar} (NPE), verd.) 4,76-4,65 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂ -) 3,32-3,25 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂ -)	7,55-7,23 ppm (H-C(1'), verd.) 6,21-6,08 ppm (H-C(3')) 4,98-4,87 ppm (H-C(4')) 4,63-4,52 ppm (2 H-C(5')) 3,48-3,35 ppm (H _β -C(2')) 2,55-2,45 ppm (H _α -C(2'))
118	8,07-8,00 ppm (H _{Ar} (Ph)) 7,48-7,39 ppm (H _{Ar} (Ph), verd.) 7,48-7,39 ppm (2-NH ₂ , verd.)	8,19-8,15 ppm (H _{Ar} (NPE)) 7,65-7,61 ppm (H _{Ar} (NPE)) 4,66-4,60 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂ -) 3,24-3,20 ppm (4-O-CH ₂ - CH ₂ -)	7,17-7,12 ppm (H-C(1')) 3,76-3,35 ppm (H-C(3'), H-C(4'), H-C(5')) 2,93-2,81 ppm (H _β -C(2')) 1,99-1,88 ppm (H _α -C(2'))
119	7,97-7,89 ppm (H _{Ar} (Ph), verd.) 7,54-7,15 ppm (H _{Ar} (Ph), verd.) 2,63-2,52 ppm (2-SCH ₃ , verd.)	8,21-8,17 ppm (H _{Ar} (NPE)) 7,54-7,15 ppm (H _{Ar} (NPE)) 4,85-4,53 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂) 3,41-3,18 ppm (4-O-CH ₂ - CH ₂)	7,54-7,15 ppm (H-C(1'), verd.) 6,12 ppm (H-C(3')) 4,85-4,53 ppm (H-C(4'), 2 H-C(5')) 3,41-3,18 ppm (H _β -C(2'), verd.) 2,63-2,52 ppm (H _α -C(2'), verd.)
121	8,17-8,12 ppm (H _{Ar} (Phe), verd.) 7,58-7,14 ppm (H _{Ar} (Phe), verd.) 3,50 ppm (2-SO ₂ -CH ₃)	8,17-8,12 ppm (H _{Ar} (NPE), verd.) 7,58-7,14 ppm (H _{Ar} (NPE), verd.) 4,91 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂ -) 2,96 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂)	7,26-7,20 ppm (H-C(1')) 6,05 ppm (H-C(3')) 4,74-4,53 ppm (H-C(4'), 2 H-C(5')) 3,43-3,20 ppm (H _β -C(2'), verd.) 2,65 ppm (H _α -C(2'))

Tab.8.2 : ¹H-NMR-Daten der Verbindungen **116-119** und **121**, Angaben in ppm (δ-Skala) bezogen auf TMS

9. DARSTELLUNG DER PHOSPHITAMID-BAUSTEINE

Die geplante Verwendung der Isoxanthopterin-Nucleoside in der Oligonucleotid-Synthese nach den Phosphitamid-Verfahren erforderte ihre Derivatisierung zu den entsprechenden Phosphitamid-Bausteinen. Dies beinhaltete die Einführung einer säurelabilen temporären Schutzgruppe in die 5'-OH-Position und die Einführung der zur Knüpfung der Internucleotidbindung erforderlichen Phosphor-(III)-Komponente an der 3'-Hydroxyl-Funktion.

9.1. Einführung der Dimethoxytrityl-Funktion

Zur Blockierung der 5'-Hydroxyl-Funktion werden sowohl nach der Acyl-^[275], wie auch nach der NPE-Strategie^[282-296] mono- oder dimethoxysubstituierte Tritylgruppen^[236] (MMTr/DMTr) verwendet. Wegen ihrer höheren Labilität unter sauren Bedingungen wird die Dimethoxytritylgruppe in der Regel bevorzugt. Sie erlaubt kürzere Abspaltzeiten bzw. mildere Abspalt-Bedingungen, was die Gefahr säurekatalysierter Depurinierungen im Oligonucleotid verringert. Die Einführung dieser Schutzgruppen geschieht nach Standardprozeduren durch Umsetzung eines 5'-OH-freien Nucleosids in trockenem Pyridin mit dem entsprechenden Tritylchlorid und anschließende säulenchromatographische Reinigung.

Die 5'-OH-Gruppe besitzt als primärer Alkohol gegenüber 3'-OH aus sterischen Gründen eine höhere Reaktivität, weshalb bei dieser Reaktion bevorzugt die 5'-Position verethert wird. Als Nebenprodukte können in kleineren Mengen auch die 3'-Trityl- und die 3',5'-bis-Trityl-Verbindungen auftreten, welche sich bei der säulenchromatographischen Reinigung jedoch meist gut abtrennen lassen.

Zur Synthese ihrer entsprechenden Tritylverbindungen wurden die OH-freien Nucleoside **99**, **115** und **118** jeweils mehrmals in trockenem Pyridin mit 1,1 Äquivalenten Dimethoxytritylchlorid umgesetzt (Abb.9.1). Nach Reaktionszeiten von 12 h bei Raumtemperatur erfolgte die chromatographische Aufarbeitung und Reinigung.

Bei dem am Aglycon nicht geschützten Isoxanthopterin-Nucleosid **99** konnte kein Umsatz beobachtet bzw. kein Produkt isoliert werden. Dagegen ließen sich ausgehend von den beiden O⁴-geschützten Derivaten, dem 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**115**) bzw. dem 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**118**) die entsprechenden 5'-O-Dimethoxytrityl-Verbindungen in Ausbeuten von 32% bzw. 65% erhalten.

Verglichen mit den bei Standard-Nucleosiden üblichen Tritylierungsausbeuten liegen die Ergebnisse beim 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**123**) und dem 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**124**) relativ niedrig. Das Problem bei der Tritylierung der O⁴-geschützten Nucleoside **115** und **118** bildete das Auftreten von Nebenprodukten, was die chromatographische Aufarbeitung insbesondere bei der Synthese von **123** stark beeinträchtigte.

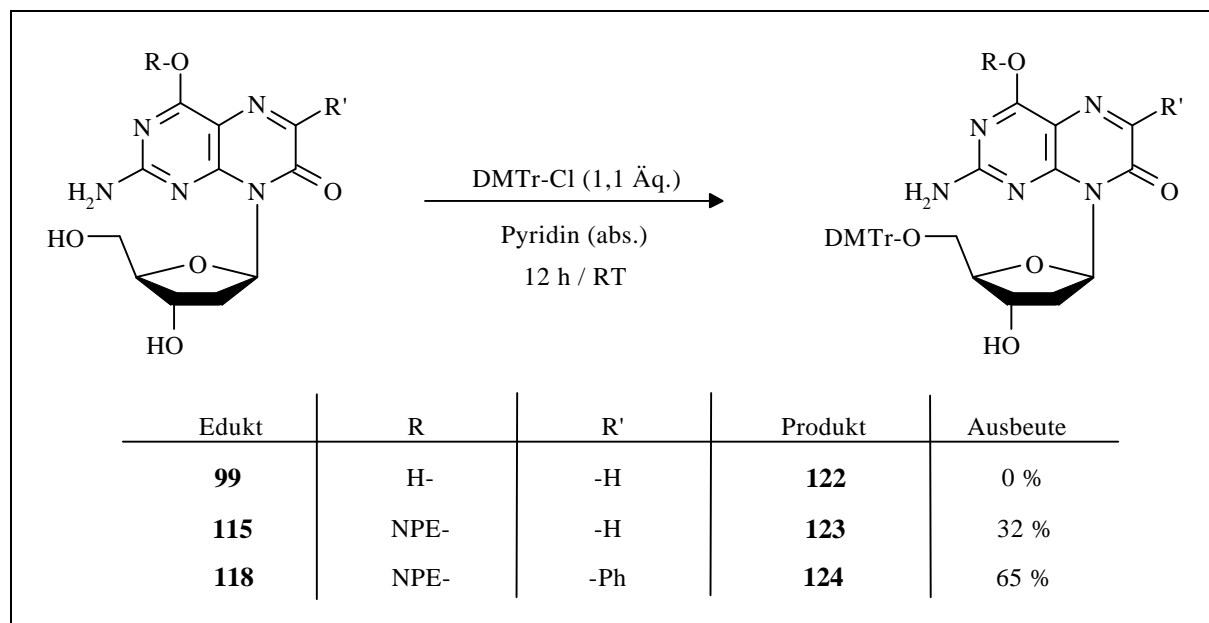


Abb.9.1 : Tritylierung der 5'-OH-Funktion der Isoxanthopterin-Nucleoside

Bereits während verschiedener anderer Synthesen auf Nucleosidstufe hatte sich gezeigt, daß ein am Aglycon komplett entschütztes Isoxanthopterin über Kieselgelchromatographie nicht aufzureinigen ist. Aufgrund der hohen Polarität der heterocyclischen Base bleiben diese Verbindungen auf der Säule. Zu ihrer Elution müßten EE/MeOH- oder CHCl₃/MeOH-Gradienten mit hoher Methanol-Konzentration verwendet werden, was jedoch zu einer Verunreinigung durch mitgelöstes Kieselgel führen würde. Daher ist ausgehend von **99** ohne Einführung weiterer Schutzgruppen am Aglycon keine Derivatisierung zum Phosphitamid möglich.

9.2. Phosphitylierung

Die nach dem Phosphitamid-Verfahren^[262-274] verwendeten monomeren Bausteine besitzen als reaktive Funktion an der 3'-O-Position ein dreiwertiges Phosphorzentrum, dessen weitere Positionen durch eine geschützte Hydroxylfunktion und ein Dialkylamin belegt sind. Sowohl nach der Acyl-^[275] als auch nach der NPE-/NPEOC-Strategie^[282-296] hat sich dabei eine

Kombination aus 2-Cyanoethyl-Schutz für die Hydroxylfunktion und einem Diisopropylamin als Amidkomponente bewährt.

Zur Einführung dieser Phosphorkomponente in die 3'-OH-Position können dabei mono- und bis-funktionelle Reagentien verwendet werden (Abb.9.2). Die monofunktionellen Reagentien weisen als Säurechloride eine deutlich höhere Reaktivität auf und benötigen keine weitere Aktivierung. Es muß allerdings eine Base (N-Ethyl-diisopropylamin : Hünigs Base) zugesetzt werden, um das entstehende HCl abzufangen und so eine Detritylierung zu verhindern. Dagegen müssen die bisfunktionellen Reagentien durch milde Säuren (1-H-Tetrazol) für die Phosphitylierung aktiviert werden, wobei intermediär eine der Dialkylamino-Komponenten durch Tetrazol substituiert wird. Dieses Verfahren ist aufgrund der geringeren Reaktivität und der milderer Bedingungen selektiver und birgt weniger die Gefahr von Nebenreaktionen. Zudem sind die bisfunktionellen Reagentien stabiler und daher besser handhabbar als die Säurechloride.

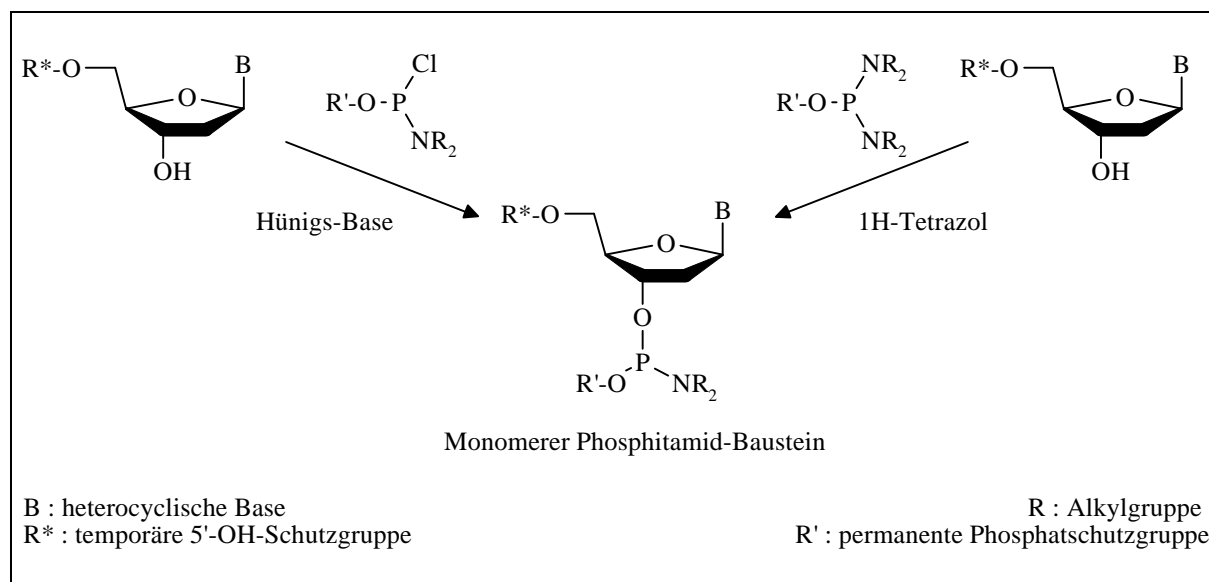


Abb.9.2 : Synthese eines Phosphitamid-Bausteins

Zur Phosphitylierung der beiden Tritylverbindungen **123** und **124** wurde ein bisfunktionelles Reagenz, das bis-N,N-Diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphan (**125**), verwendet. **125** läßt sich nach einer Vorschrift von Kraszewski und Norris^[341] ausgehend von Phosphor-(III)-chlorid darstellen. Das bei äquimolarer Reaktion von PCl_3 mit 2-Cyanoethanol erhaltene Zwischenprodukt wird direkt weiter mit 5 Äquivalenten Diisopropylamin in Diethylether bei tiefen Temperaturen umgesetzt. Das so erhaltene **125** wird destillativ gereinigt und fällt als farbloses Öl an, das über längere Zeit unter Schutzgas im Gefrierfach lagerfähig ist.

Die Durchführung der Phosphitylierungsreaktionen erfolgte nach Vorgaben von Stengele^[341,342] und Rösler^[98] durch Zugabe von 1,1 - 1,25 Äquivalenten bis-N,N-Diisopropylamino-2-cyano-

ethoxyphosphan (**125**) und 0,5 Äquivalenten Tetrazol (**126**) unter Schutzgas in absolutem Lösungsmittel.

Da sich das 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**123**) in reinem Acetonitril nur schlecht löst, wurde in diesem Fall, wie schon bei Rösler^[98] beschrieben, ein Gemisch aus Acetonitril und Methylenchlorid verwendet.

Die Ausbeute bei der Phosphitylierung des 6-H-substituierten 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**123**) zu **127** lag anfangs bei lediglich 27 %. Während das DC der Reaktion deutlich bessere Ergebnisse zeigte, ergab die Aufarbeitung große Ausbeuteverluste. Das Ergebnis dieser Reaktion ließ sich jedoch auf 71% steigern, indem die Länge der Kieselgelsäule bei der chromatographischen Reinigung stark reduziert wurde.

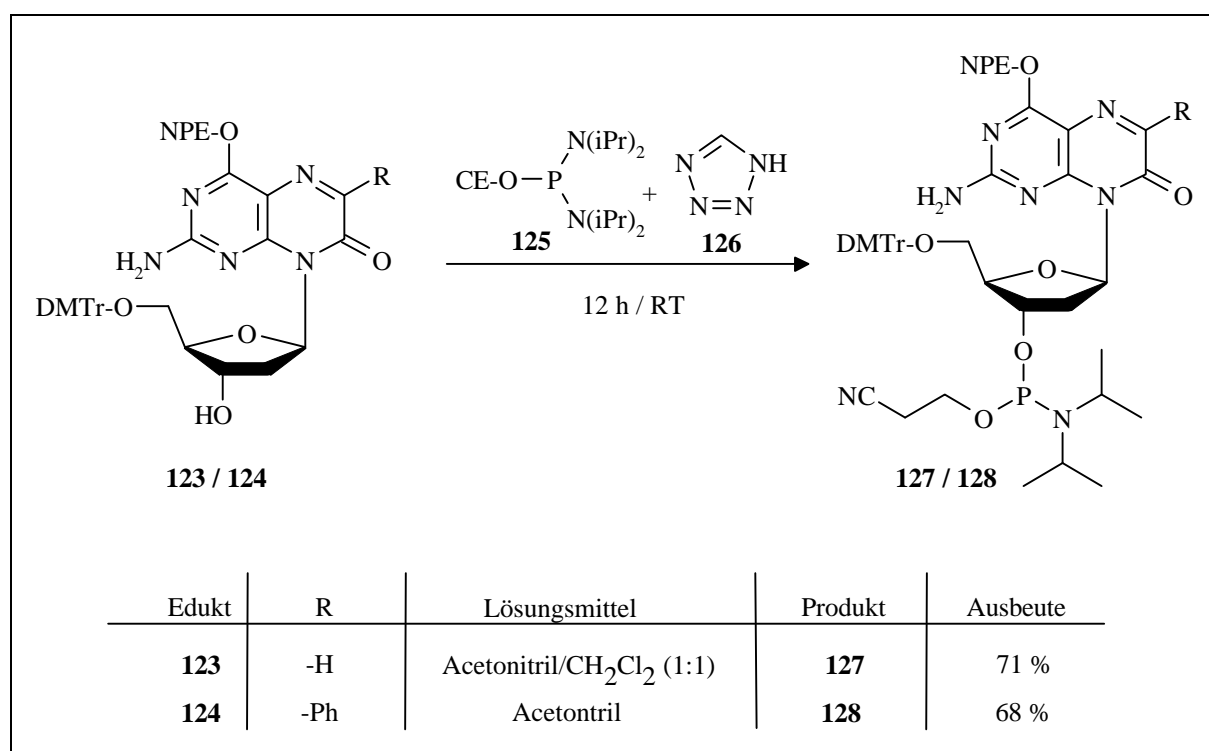


Abb.9.3 : Phosphitylierung der 3'-OH-Funktion der tritylierten Isoxanthopterin-Nucleoside

9.3. Spektroskopische Daten

9.3.1. UV-Absorptionsspektren

Die UV-Spektren der Tritylverbindungen **123** und **124**, sowie der Phosphitamide **127** und **128** entsprachen den Erwartungen für diesen Verbindungstyp. Die Einführung der Tritylfunktion macht sich im Bereich nahe 200 nm stark bemerkbar, die log ε-Werte bei 205 nm steigen auf

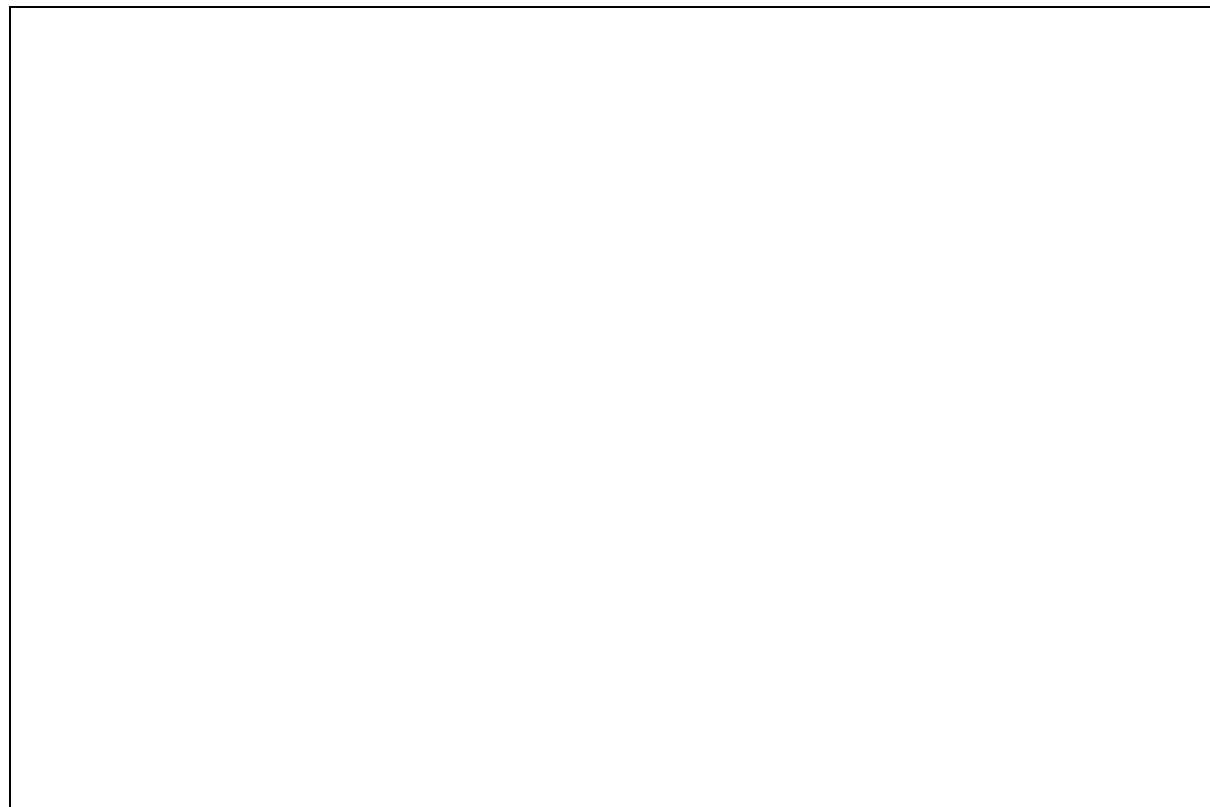
4,8-4,95. Daneben wird auch bei 237 nm eine zusätzliche, verglichen mit den Pteridinabsorptionen intensive Bande, mit log ϵ -Werten zwischen 4,4 und 4,56 erhalten. Die längstwellige Absorptionsbande ändert sich hingegen nicht.

Unterschiede zwischen den Tritylverbindungen und den entsprechenden Phosphitamidin im UV-Spektrum bestehen nicht. Die Phosphorkomponente bringt weder neue UV-aktive Chromophore in das Molekül noch stört sie aufgrund ihrer Positionierung an der 3'-Position bestehende.

Die UV-Daten der Verbindungen **123**, **124**, **127** und **128** in Methanol sind in Tabelle 9.1 zusammengestellt. In Abb.9.4 sind sich die UV-Spektren der beiden Phosphitamid-Bausteine **127** und **128** gegenübergestellt. Ein Vergleich der Tritylverbindungen **123** und **124** würde einen annähernd identischen Kurvenverlauf zeigen.

N°	λ_{\max} [nm]				log ϵ				LM/pH
123	205	237	272	348	4,94	4,56	4,25	4,15	MeOH
124	205	237	[271]	374	4,81	4,43	[4,19]	4,23	MeOH
127	205	238	272	348	4,90	4,52	4,21	4,15	MeOH
128	205	238	[271]	374	4,80	4,42	[4,19]	4,22	MeOH

Tab.9.1: UV-Daten der Tritylverbindungen und der Phosphitamide



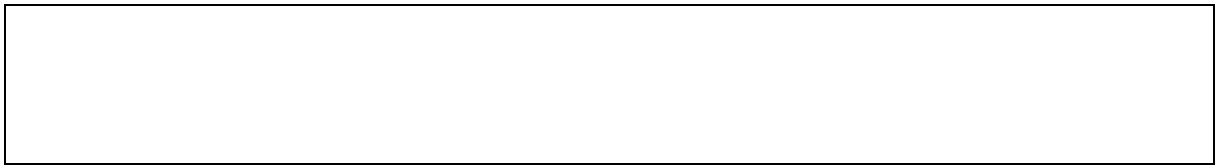


Abb.9.4 : UV-Spektren-Vergleich der Phosphitamid-Bausteine **127** und **128** in Methanol

9.3.2. ^1H -NMR-Spektren

Die Einführung der Dimethoxytritylgruppe in die 5'-Position des Zuckers beeinflusst im ^1H -NMR lediglich die Lage der an C(5') gebundenen Protonen. Diese werden um etwa 0,5 ppm zu höherem Feld hin verschoben. Die übrigen Protonen-Resonanzsignale der Zuckerregion bleiben hingegen weitgehend unbeeinflusst.

Die DMTr-Gruppe liefert zwei Sätze von zusätzlichen Signalen im Aromatenbereich. Während die vier zu den Methoxygruppen orthoständigen Protonen ein Multiplett bei 6.8 ppm ergeben, erscheint der Rest bei tieferem Feld zwischen 7,5 und 7,15 ppm. Die beiden Methoxygruppen selbst liefern ein charakteristisches Signal bei 3,8 ppm.

Als Beispiel für eine derartige Tritylverbindung ist in Abb.9.5 das ^1H -NMR-Spektrum des tritylierten Isoxanthopterin-Nucleosids **123** in CDCl_3 abgebildet.

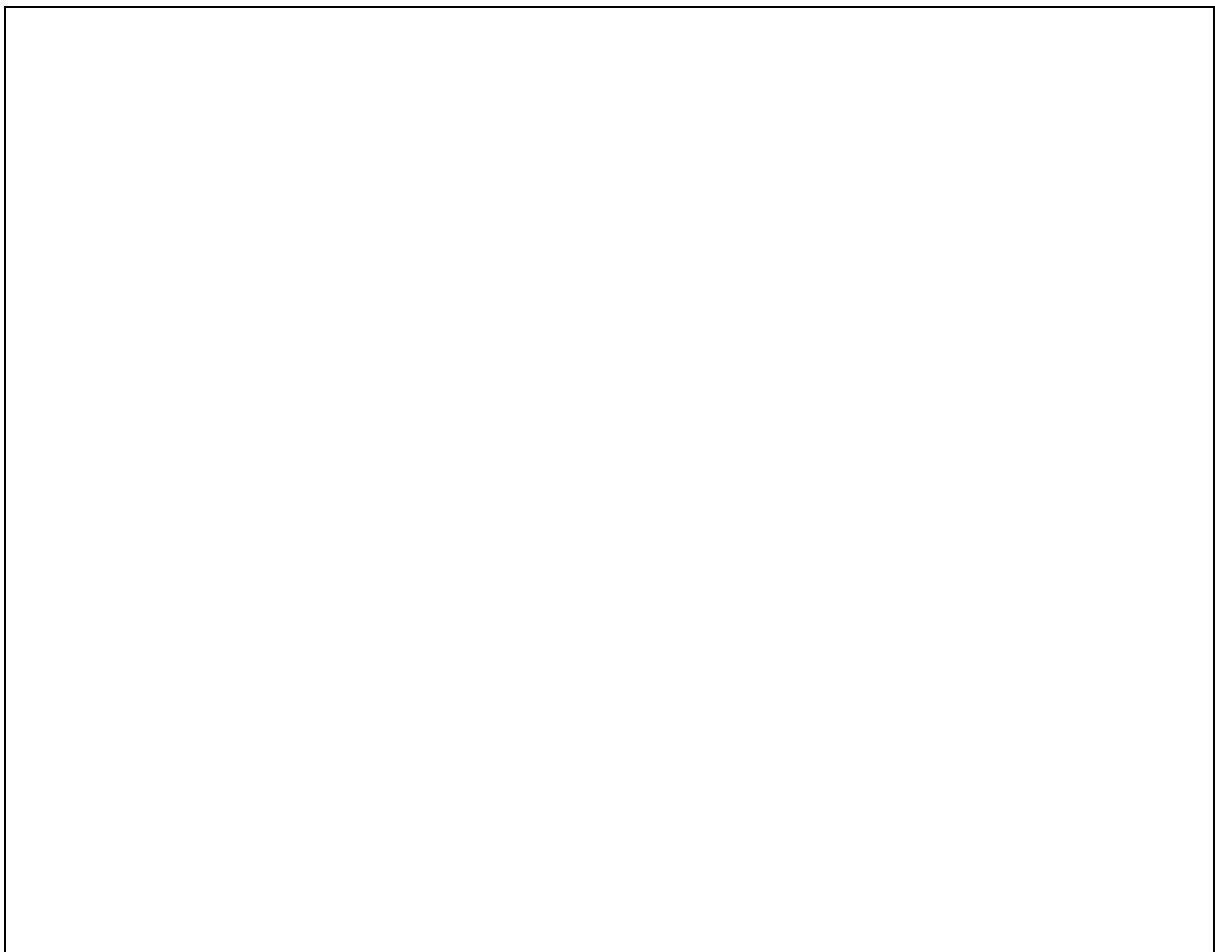


Abb.9.5 : ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **123** in CDCl_3

Bei der Einführung der Phosphorkomponente in die 3'-Position werden zwei Diastereomere erhalten. Dies bedeutet, daß im $^1\text{H-NMR}$ durch Verdopplung der Resonanzsignale ein wesentlich komplexeres Spektrum resultiert. An zusätzlichen Signalen tauchen die Methylprotonen der Isopropylgruppen (12H als Multipllett bei 1,1 ppm), die Methinprotonen derselben Funktionen (2H als Multipllett bei 3,7 ppm) sowie die beiden Methylenprotonen-Signalsätze der Cyanoethyl-Funktion auf. Letztgenannte ergeben ein Tripllett bei 3,5 ppm für die zum Sauerstoff α -ständige CH_2 -Gruppe und zwei Tripletts zwischen 2,2 und 2,6 ppm für die zum Sauerstoff β -ständige CH_2 -Gruppe.

In Abb.9.6 findet sich wiederum als Beispiel das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Isoxanthopterin-Phosphitamid-Bausteins **127** in CDCl_3 .

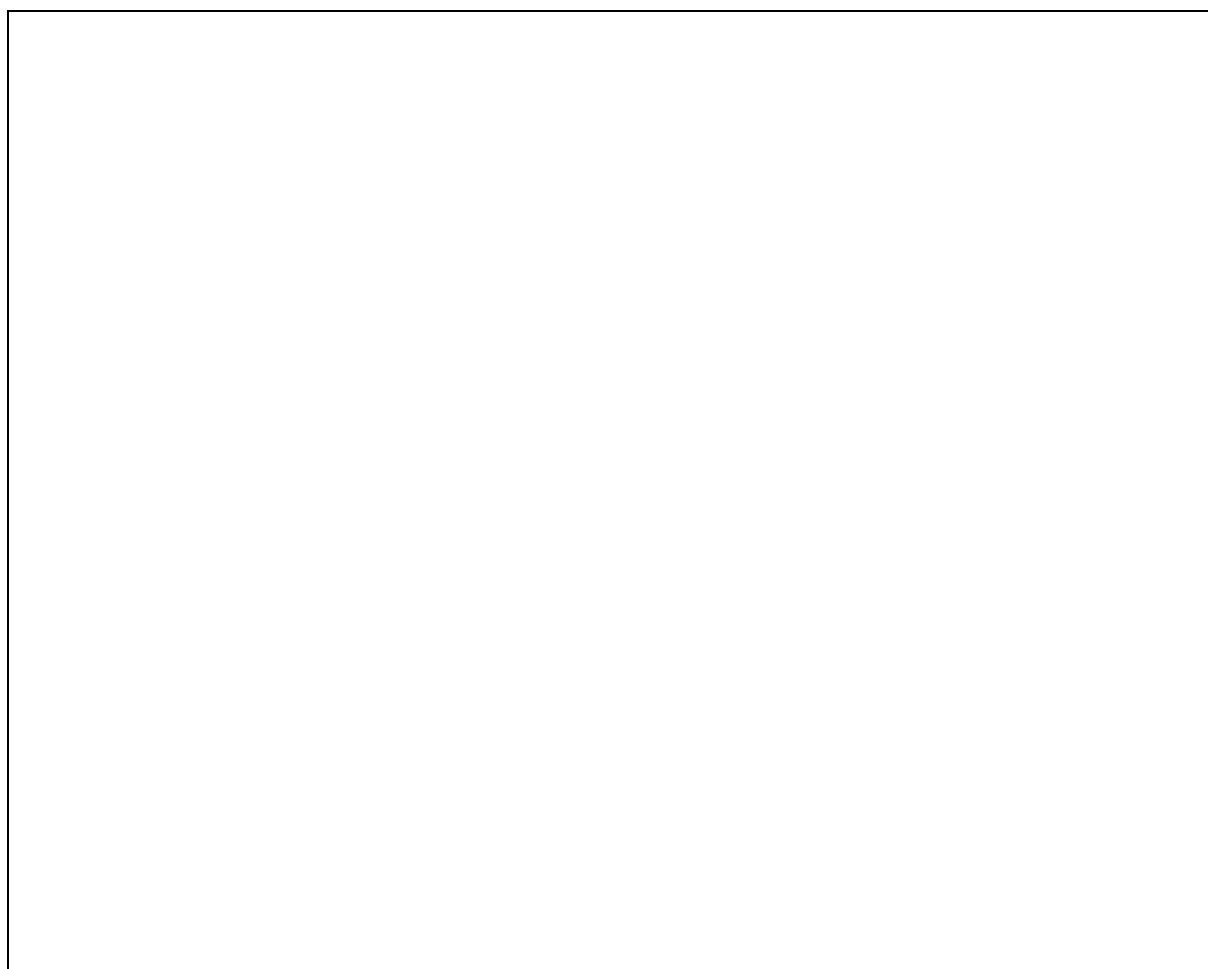


Abb.9.6 : $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **127** in CDCl_3

Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten der Verbindungen **123**, **124**, **127** und **128** sind in Tabelle 9.2 zusammengefaßt.

Nr.	Aglycon + NPE	Zucker-Protonen	5'-O-Substituent	
123	8,11-8,06 ppm (H _{Ar} (NPE)) 7,70 ppm (H-C(6)) 7,39-7,06 ppm (H _{Ar} (NPE)) 5,00 ppm (2-NH ₂) 4,62 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂ -) 3,29 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂ -)	7,39-7,06 ppm (H-C(1'), verd.) 4,77 ppm (H-C(3')) 3,89 ppm (H-C(4')) 3,49 ppm (H-C(5')) 3,38 ppm (H-C(5')) 2,99-2,88 ppm (H _β -C(2')) 2,32-2,20 ppm (H _α -C(2'))	7,39-7,06 ppm (H _{Ar} (DMTr)) 6,74-6,69 ppm (H _{Ar} (DMTr)) 3,72 ppm (2 OCH ₃)	2,09
124	8,19-8,15 ppm (H _{Ar} (NPE)) 8,09-7,97 ppm (H _{Ar} (Phe)) 7,65-7,61 ppm (H _{Ar} (NPE)) 7,41-7,14 ppm (H _{Ar} (Phe), verd.) 7,41-7,14 ppm (2-NH ₂ , verd.) 4,66-4,60 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂ -) 3,24-3,20 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂ -)	7,11-7,05 ppm (H-C(1')) 4,12 ppm (H-C(3')) 3,72-3,35 ppm (H-C(4'), 2H-C(5'), verd.) 2,93-2,81 ppm (H _β -C(2')) 1,99-1,88 ppm (H _α -C(2'))	7,46-7,14 ppm (H _{Ar} (DMTr)) 6,78-6,71 ppm (H _{Ar} (DMTr)) 3,72-3,35 ppm (2 OMe, verd.)	5,64
127	8,17-8,14 ppm (H _{Ar} (NPE)) 7,78 ppm (H-C(6)) 7,35-7,15 ppm (H _{Ar} (NPE)) 5,06 ppm (2-NH ₂) 4,68 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂ -) 3,27 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂ -)	7,35-7,15 ppm (H-C(1'), verd.) 4,80 ppm (H-C(3')) 4,22 ppm (H-C(4')) 3,63-3,41 ppm (2 H-C(5') verd.) 2,99 ppm (H _β -C(2')) 2,62-2,25 ppm (H _α -C(2'), verd.)	7,48-7,41 ppm (H _{Ar} (DMTr)) 7,35-7,15 ppm (H _{Ar} (DMTr)) 6,78-6,71 ppm (H _{Ar} (DMTr)) 3,74 ppm (2 OCH ₃)	3,63 2,62 2,62 1,17
128	8,21-8,15 ppm (H _{Ar} (NPE)) 8,09-7,97 ppm (H _{Ar} (Phe)) 7,59-7,49 ppm (H _{Ar} (NPE)) 7,46-7,10 ppm (H _{Ar} (Phe), verd.) 5,10-5,04 ppm (2-NH ₂) 4,68-4,62 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂ -) 3,24-3,20 ppm (4-O-CH ₂ -CH ₂ -)	7,46-7,10 ppm (H-C(1'), verd.) 4,30-4,21 ppm (H-C(3')) 3,68-3,35 ppm (H-C(4'), 2 H-C(5')) 3,05-2,93 ppm (H _β -C(2')) 2,39-2,26 ppm (H _α -C(2'))	7,46-7,10 ppm (H _A (DMTr), verd.) 6,75-6,65 ppm (H _{Ar} (DMTr)) 3,72-3,64 ppm (2 OMe)	3,78 2,60 2,35 1,21

Tab.9.2 : ¹H-NMR-Daten der Verbindungen **123**, **124**, **127** und **128**, Angaben in ppm (δ-Skala) bezogen auf Lösungsmittelsignal

9.3.3. ^{31}P -NMR-Spektren

Eine weitere Methode zur Reinheitsüberprüfung von Phosphitamidien ist die ^{31}P -NMR-Spektroskopie. In der Regel werden dabei für Phosphitamide Resonanz-Signale bei etwa 150 ppm erhalten. Diese ergeben, da es sich bei den Verbindungen um Diastereomeren-Paare handelt, zwei dicht beieinanderliegende Singulets.

Im ^{31}P -NMR lassen sich auch Verunreinigungen durch Oxidations- und Hydrolyse-Produkte erkennen. Phosphor-(V)-enthaltende Substanzen und auch durch Hydrolyse des überschüssigen Phosphitylierungsreagenzes erhaltenes H-Phosphonat ergeben Signale, die im Bereich von 0-20 ppm auftreten.

Die Aufnahme der ^{31}P -NMR-Spektren der beiden Phosphitamide **127** und **128** erfolgte in Deuteriochloroform gegen 85%-ige Phosphorsäure als externem Standard. Dabei wurde für das Isoxanthopterin-phosphitamid **127** ein Dublett bei 149,05 und 148,97 ppm erhalten. Das 6-Phenylisoxanthopterin-phosphitamid **128** ergab ein Dublett bei 149,19 und 149,14 ppm, also bei geringfügig tieferem Feld.

Die in den Abb.9.7 und 9.8 dargestellten ^{31}P -NMR-Spektren zeigen die Reinheit der erhaltenen Phosphitamide **127** und **128** bezüglich der Phosphorkomponente.

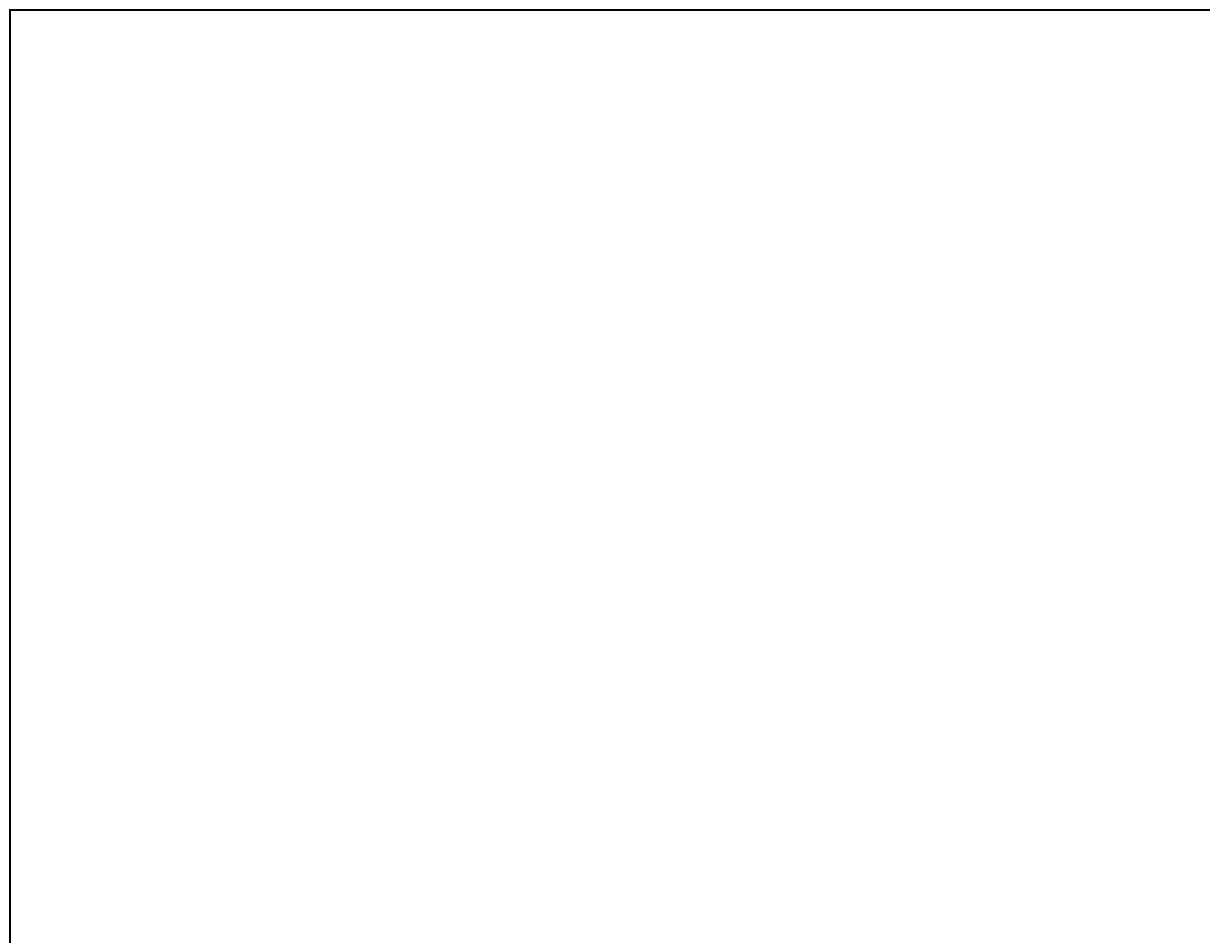


Abb.9.7 : ^{31}P -NMR-Spektrum von Verbindung **127** in CDCl_3

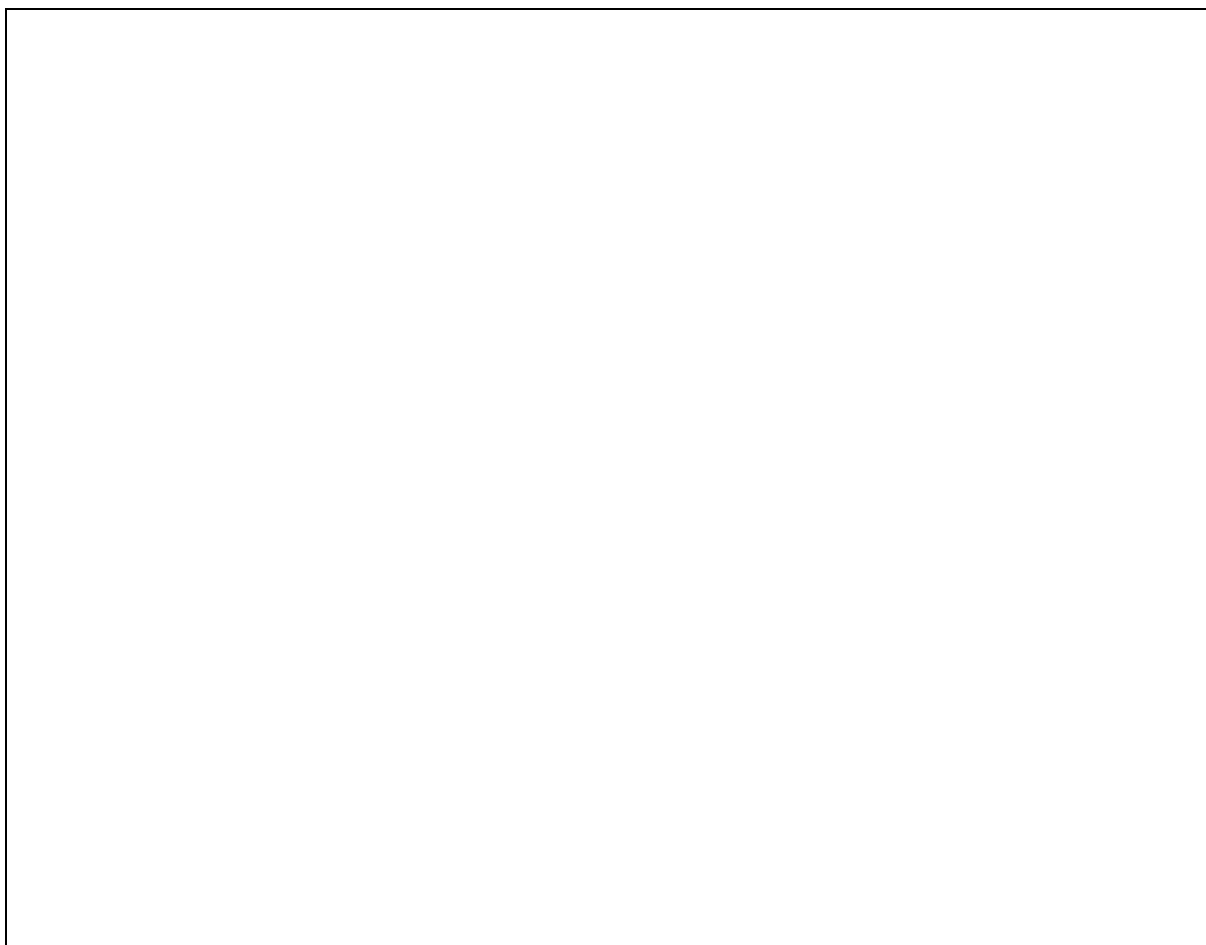


Abb.9.8 : ³¹P-NMR-Spektrum von Verbindung **128** in CDCl₃

10. DIE AUTOMATISIERTE FESTPHASENSYNTHESE VON OLIGO-NUCLEOTIDEN

10.1. Die Festphasensynthese

Die aus den frühen 60-er Jahren stammende Idee Merrifields^[344-346], die repetitiven Schritte der Peptidsynthese statt in Lösung an fester Phase durchzuführen, übertrug Letsinger^[242,347] wenige Jahre später auf die Darstellung von Oligonucleotiden. Allerdings stand erst Anfang der 80-er Jahre mit der durch Caruthers^[261-263] entwickelten Phosphitamid-Methode ein Verfahren zur Verfügung, welches sich effizient mit der Festphasentechnik verbinden ließ. Diese Kombination ermöglichte die Fortentwicklung, den Durchbruch und letztlich auch die Kommerzialisierung der Oligonucleotidsynthese. So ist heute die Darstellung oligomerer DNA-Sequenzen an, von einer Reihe von Firmen angebotenen, Syntheseautomaten für verschiedenste Zwecke zur Routine geworden.

Die Art und Beschaffenheit des Trägermaterials ist bei Festphasensynthesen von entscheidender Bedeutung. Die feste Matrix sollte in den verwendeten Solventien unlöslich und gegenüber den bei der Synthese verwendeten Reagentien inert sein. Das Material darf die zur Kettenverlängerung notwendigen Reaktionsschritte nicht behindern, es muß genügend Raum für das wachsende Oligomer zur Verfügung stehen und die Diffusion der Reagentien sollte möglichst schnell erfolgen können. Zudem müssen funktionelle Gruppen an der Oberfläche vorhanden sein, an welchen die Startnucleoside verankert werden können. Standardmäßig werden heute spezielle anorganische Kieselgelmateriale, die controlled-pore-glass-Träger (CPG), eingesetzt^[264,348-351]. Diese zeichnen sich durch hohe mechanische und weitgehende chemische Stabilität, sowie durch definierte und homogene Porengröße aus. Neuere Entwicklungen sind nichtquellende Polystyrol-Materialien wie Fractogel^[352] und Tentagel^[353-355]. Für eine Übersicht über Vor- und Nachteile der verschiedenen Trägermaterialien für die Synthese von Oligonucleotiden sei an dieser Stelle auf die Arbeit von Jan Weiler^[356] verwiesen.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ausschließlich CPG-Träger mit einer Porengröße von 500Å verwendet. Dieses Material eignet sich nach McBride^[357] zur Darstellung von Oligonucleotiden einer Kettenlänge von bis zu 100 Bausteinen. Für längere Oligomere müssen Träger mit höherer Porengröße eingesetzt werden, da ansonsten die Kondensationsausbeuten aufgrund sterischer Einflüsse stark absinken.

Für die Darstellung eines Oligonucleotids an fester Phase wird das Startnucleosid über seine 3'-OH-gruppe am Träger gebunden. Das Nucleosid wird mit einer Dicarbonsäure verestert, wobei zumeist mit Bernsteinsäureanhydrid das entsprechende 3'-Succinat dargestellt wird. Dieser Baustein wird anschließend unter Aktivierung durch EDC (N-Ethyl-N'-{3-dimethylaminopropyl}carbodiimid) oder TOTU (O-{{Cyano-{ethoxycarbonyl}methyliden}amino-1,1,3,3-tetramethyl}-uronium-tetafluoroborat) mit einem geeignet derivatisierten Trägermate-

rial gekoppelt (Abb.10.1). Dieses kann aus Glyceryl-CPG durch Behandlung mit Carbonyldiimidazol und einem Diaminoalkan erhalten werden.

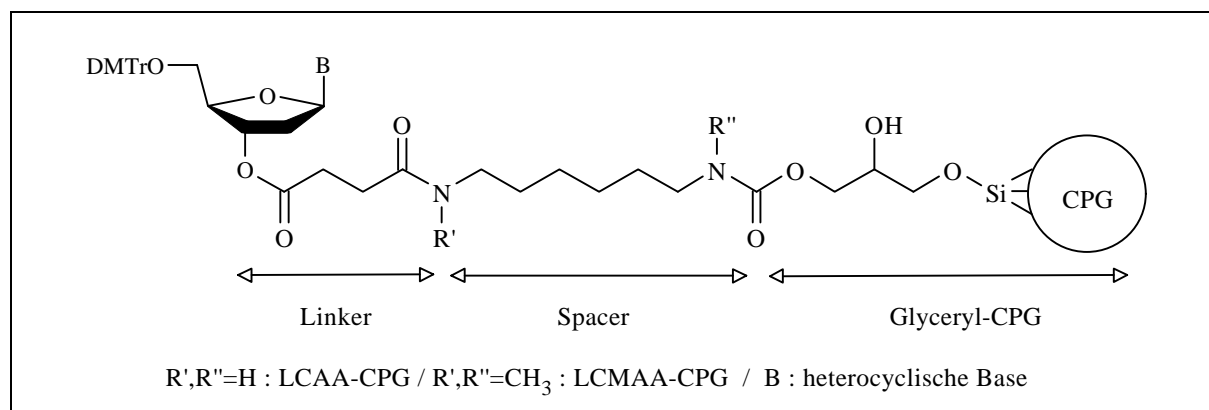


Abb.10.1 : Anbindung des Startnucleosids an ein CPG-Trägermaterial

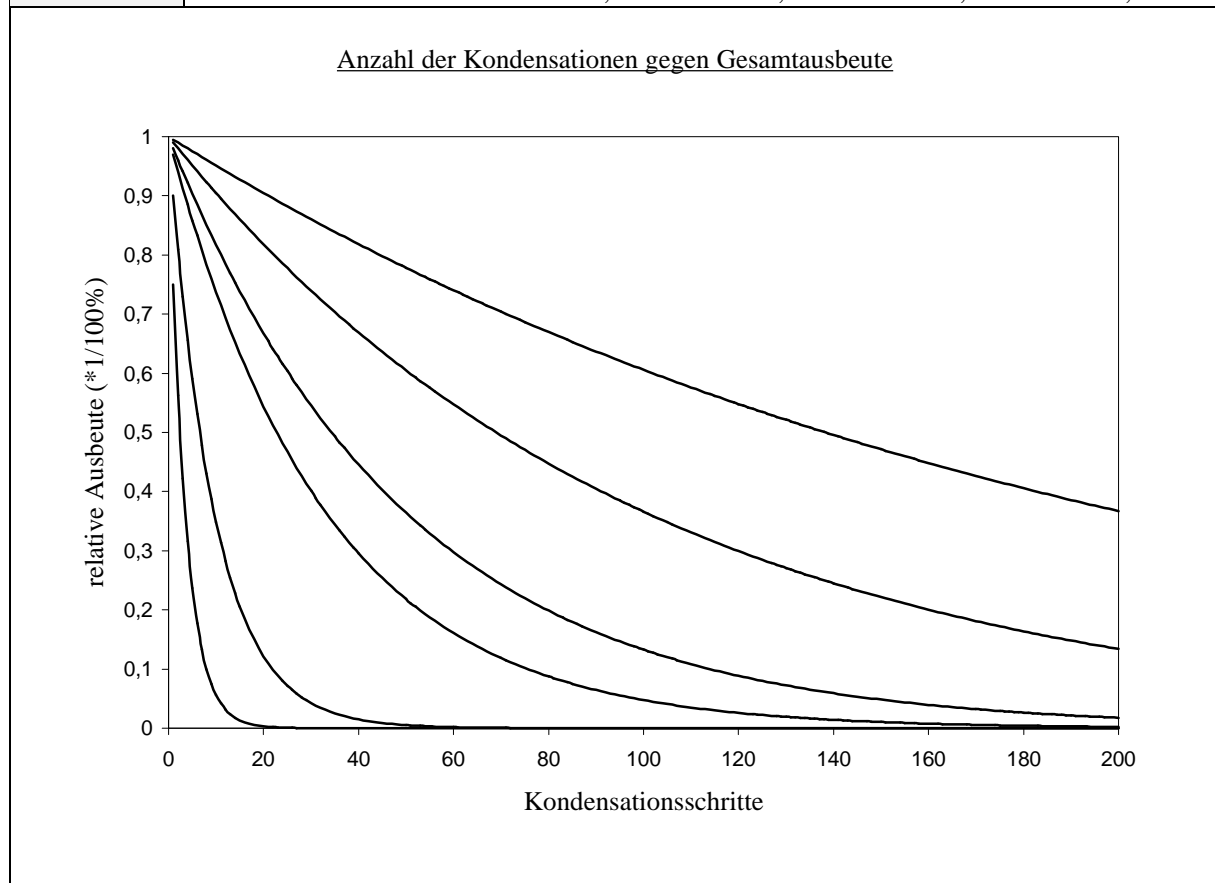
Kommerziell erhältlich sind LCAA-CPG-Materialien (Long-Chain-Alkyl-Amino-CPG, $R=H$), die über Succinyl-Linker mit den nach der Acylstrategie geschützten Startnucleosiden beladen sind. Bei Verwendung β -eliminierbarer Schutzgruppen erwies sich das LCAA-System allerdings als ungeeignet^[295,358-361]. Das zur Schutzgruppen-Abspaltung verwendete DBU kann durch Deprotonierung des Amids an der Bindungsstelle zwischen Linker und Spacer eine intramolekulare nucleophile Substitution an der benachbarten Esterfunktion einleiten, was zur Trägerabspaltung führt. Stengele^[361] konnte dieses Problem durch Methylierung der beiden Säureamidfunktionen umgehen. Das LCMAA-CPG-Material (Long-Chain-Methyl-Alkyl-Amino-CPG) bei dem anstelle des 1,6-Diaminohexans das 1,6-Bis-methylamino-hexan als Spacer verwendet wird, ist gegenüber DBU stabil^[361-363].

Durch die Fixierung des Oligonucleotids an einem festen, unlöslichen Trägermaterial wird für die Reaktionen praktisch ein Zwei-Phasen-System geschaffen. Einfache Filtrations- und Waschschrte erlauben die Abtrennung überschüssiger Reagentien. Dies bedeutet einen drastischen Zeitvorteil gegenüber der Lösungssynthese, bei welcher die Isolierung des Produkts nach jeder einzelnen Kondensation sehr zeitaufwendig ist. Die Einfachheit des synthetischen Konzepts erlaubt es, die Reagentien im Überschuß einzusetzen. Auch die Wiederholung einzelner Syntheseschritte ist problemlos möglich, was sich positiv auf Kondensationsausbeuten und Reaktionszeiten auswirkt.

Ein Hauptproblem bei Festphasensynthesen liegt in der Notwendigkeit, möglichst quantitative Umsätze in jedem Schritt erhalten zu müssen. Ergibt eine Kondensation beispielsweise „nur“ 90% Ausbeute, so werden die nicht umgesetzten 10% nicht abgetrennt, sondern verbleiben bis zum Ende der Gesamtsynthese ebenfalls am Träger. Bei mehreren derartigen Schritten erhält man am Ende der Synthese ein sehr komplexes Gemisch, aus welchem das gewünschte

Produkt erst isoliert werden muß. In der folgenden Tabelle 10.1 und dem zugehörigen Diagramm läßt sich die Auswirkung einer niedrigen Kondensationsausbeute auf die erreichbare Produktmenge ansehen (Diagramm : Linien von oben nach unten : 99,5%, 99%, 98%, 97%, 90%, 75%).

Länge des Oligomers	durchschnittliche Kondensationsausbeute					
	75%	90%	97%	98%	99%	99,5%
10-mer	7,5%	38,7%	76,0%	83,4%	91,3%	95,6%
25-mer	0,1%	8,0%	48,1%	61,6%	78,6%	88,7%
50-mer	-	0,6%	22,5%	37,2%	61,1%	78,2%
100-mer	-	-	4,9%	13,5%	37,0%	60,9%
200-mer	-	-	0,2%	1,8%	13,5%	36,9%



Tab.10.1 : Verhältnis von Gesamtausbeute des Oligomers zur schrittweisen Kondensationsausbeute

Kurven von oben nach unten im Diagramm : 99.5%, 99%, 98%, 97%, 90%, 75%

10.2. Die automatisierte Festphasensynthese

Repetitive Techniken, wie sie bei den in Kap.6.1. aufgeführten Synthesemethoden zum Aufbau von Oligonucleotiden verwendet werden, eignen sich generell zur Automatisierung. Abb.10.2

zeigt die Abfolge der Syntheschritte des allgemein angewandten Festphasen-Phosphoramid-Verfahrens.

Der eigentliche Cyclus läßt sich dabei in vier Schritte unterteilen, die Detritylierung, die Kondensation, das Capping und die Oxidation. Nach Beendigung der Synthese erfolgt letztlich mit der Abspaltung des Oligonucleotids der fünfte und letzte Schritt des Prozesses.

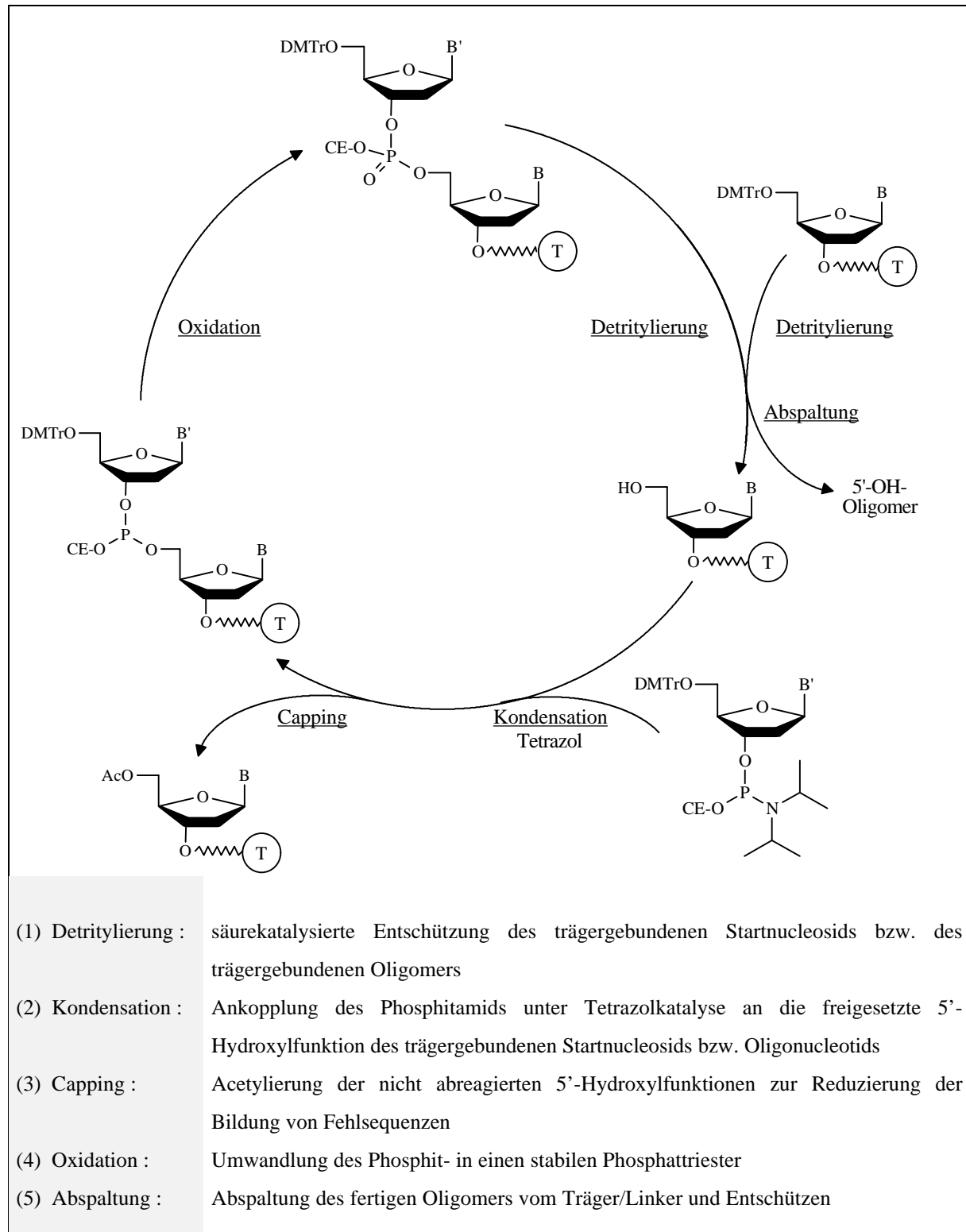


Abb.10.2: Standard-Cyclus bei der automatisierten Festphasensynthese von Oligonucleotiden

und kurze Beschreibung der einzelnen Syntheseschritte

Durch Wiederholung der Schritte (1)-(4) erfolgt der stufenweise Aufbau des Oligonucleotids. Zwischen den einzelnen Reaktionen wird das System gespült und überschüssige Reagentien aus dem Trägermaterial ausgewaschen. Nach Beendigung des Synthese erfolgt die Abspaltung des Oligomers vom Träger. Im Fall der Acylstrategie^[275] geschieht dies durch Behandlung mit 25%-igem Ammoniak, gefolgt von der Abspaltung der Schutzgruppen durch Erwärmen der Abspaltlösung auf 55°C. Bei der NPE-/NPEOC-Strategie^[282-296] werden erst die Schutzgruppen mit 1M DBU in Acetonitril abgespalten. Dies ermöglicht einen zusätzlichen Waschschriff und so die Entfernung der Schutzgruppen-Reste. Erst anschließend erfolgt die Trägerabspaltung des entschützten Oligomers durch Behandlung mit Ammoniak. Damit läßt sich das fertige Oligomer ohne Verunreinigungen durch die abgespaltenen Schutzgruppen erhalten. Bei guten Kondensationsausbeuten macht dies eine zeitaufwendige Reinigung des Oligomers somit überflüssig.

10.3. DNA-Syntheseautomaten

In Aufbau und Arbeitsweise von DNA-Synthesizern gibt es kaum prinzipielle Unterschiede. Das mit dem Startnucleosid beladene Trägermaterial wird in eine Synthesensäule gefüllt und mit dem Synthesizer verbunden. Gesteuert über einen Prozessor können nun die Lösungen der Phosphitamide und anderer Reagentien auf die Säule gepumpt werden, wobei diese zur besseren Durchmischung von unten nach oben durchflossen wird. Ein System aus Edelgasüberdruck und Gasstrahlpumpen-Vakuum sorgt für die Förderung der verschiedenen Lösungen. Die Entfernung der überschüssigen Reagentien von der Säule erfolgt durch mehrmaliges Spülen mit Acetonitril im Wechsel mit Trockenblasen durch Argon, wobei das Edelgas die Säule von oben nach unten durchströmt. Die Reagentien- und Waschlösungen werden direkt nach Gebrauch in ein Sammelfäß (waste) gepumpt, die Abspaltlösungen hingegen werden getrennt entweder zum Tritylport (TCA-Behandlung(1)) oder zum collective vial (Trägerabspaltung(5)) abgeleitet. Durch Sammlung und UV-spektroskopische Gehaltsbestimmung der Reaktionslösungen aus der Tritylgruppenabspaltung lassen sich die relativen Kondensationsausbeuten jedes einzelnen Synthesecyclusses bestimmen.

Unterschiede zwischen den Geräten bestehen in der Anzahl der Anschlußmöglichkeiten für Reagentien- und Phosphitamidflaschen. Die meisten der neueren Geräte erlauben die parallele Synthese von Oligonucleotiden an mehreren Säulen, wofür entsprechende Anschlüsse zur Verfügung gestellt werden.

Das verwendete Modell 392 B der Firma Applied Biosystems wurde speziell für Routine-Oligonucleotid-Synthesen nach der Acylstrategie konzipiert. Es verfügt daher neben zwei Säulen- und fünf Phosphitamidpositionen nur über 8 Anschlüsse für Reagentien und Lösungsmittel, die wie folgt verteilt und nummeriert sind : Phosphitamid-Lösungen (1-5), Tetrazol (9), Ammoniak (10), Cap A (11), Cap B (12), TCA (14), Iod-Lösung (15), Acetonitril (18) und Methylenchlorid (19). Für den Einsatz des Geräts unter Verwendung β -eliminierbarer Schutzgruppen bedeutet dies, daß eine der Flaschenpositionen wegen der zusätzlich benötigten DBU-Lösung doppelt belegt werden muß. Dafür eignet sich am besten die Position 12, da es sich sowohl bei der CAP B-Lösung als auch bei der DBU-Lösung um basische Reagentien handelt und beide nicht zugleich benötigt werden. Der Austausch der Flaschen erfolgt zwischen Synthese und Schutzgruppenabspaltung.

Mit den fünf Phosphitamid-Positionen besteht die Möglichkeit neben den vier Standardnucleosiden auch eine modifizierte Base einzubauen. Die monomeren Bausteine werden entsprechend eingewogen und am Gerät unmittelbar vor Beginn der Synthese über die „auto-dilute-procedure“ in Lösung gebracht. Dieses Vorgehen reduziert die Gefahr der Einkondensation von Wasser in die Phosphitamidlösungen. Das Gerät besitzt zudem einen internen UV-Detektor, über welchen am Tritylport automatisch die relative Ausbeute der einzelnen Kondensationsschritte bestimmt werden kann.

Neben der fehlenden Flaschenposition liegt der größte Nachteil des Geräts in der vergleichsweise geringen Anzahl (11) frei programmierbarer Syntheseprogramme. Ebenso steht mit der end-procedure (End01user) lediglich ein Abspaltprogramm zur Verfügung, weshalb die Optimierungsmöglichkeiten für Nichtacylstrategien etwas eingeschränkt sind.

10.4. Reagentien

Neben den gängigen Phosphitamiden und Trägern, die für die Acylstrategie benötigt werden, sind mittlerweile auch die anderen benötigten Reagentien kommerziell erhältlich. Stengele^[342,343] konnte zeigen, daß durch Verwendung selbst hergestellter Reagentien und Lösungen ohne Einbußen bei der Qualität der Synthesen die durchschnittlichen Betriebskosten von DNA-Synthesizern deutlich reduziert werden können. Daher wurden die entsprechenden Lösungen nach den Vorgaben von Stengele selbst dargestellt. Die für die fünf Schritte der Festphasen-Synthese benötigten Reagentien sind in Tabelle 10.2 zusammengefaßt. Genauere Hinweise zur Darstellung finden sich im Experimentellen Teil.

(1) Detritylierung :	3% TCA in CH ₂ Cl ₂ p.a-Qualität
(2) Kondensation :	0,5 M Lösung von Tetrazol (sublim.) + 0,1 M Phosphitamid-Lösungen in Acetonitril (f.d.DNA-Synthese)
(3) Capping :	<u>Cap A</u> : Essigsäureanhydrid (p.a.)/2,6-Lutidin (purum)/THF (p.a., dest.) im Verhältnis 1:1:8 // <u>Cap B</u> : N-Methylimidazol (purum)/THF (p.a., dest.) im Verhältnis 16:84 // Die 2 Komponenten werden erst unmittelbar vor der Reaktion in gleichem Volumenverhältnis gemischt
(4) Oxidation :	0,05 M Iod-Lösung in Wasser/ Pyridin (p.a.) / THF (p.a., dest.) im Verhältnis 2:2:7
(5) Abspaltung :	Schutzgruppen : 1M DBU in Acetonitril (f.d.DNA-Synthese) Träger : 25% Ammoniak in Wasser (p.a.)

Tab.10.2 : Die Reagentien für die Oligonucleotid-Synthese nach dem Phosphitamidverfahren an fester Phase unter Anwendung der NPE-/NPEOC-Strategie^[342,343]

10.5. Syntheseprogramme

Die Steuerung des Syntheseverlaufs am DNA-Synthesizer geschieht über verschiedene Syntheseprogramme. Im Falle von DNA-Synthesen nach der NPE-/NPEOC-Strategie am ABI 392B werden dafür vier Programme nacheinander durchlaufen: die „auto-dilute-procedure“, das eigentliche Syntheseprogramm, die Schutzgruppenabspaltung und zuletzt die Trägerabspaltung.

Die „auto-dilute-procedure“ dient zur Darstellung der benötigten Phosphitamid-Lösungen unmittelbar vor Beginn der eigentlichen Synthese. Dies verringert die Gefahr der Einkondensation von Wasser in diese Lösungen, da der Prozeß im geschlossenen System am Gerät stattfindet.

Im Verlauf der Arbeit wurden zwei verschiedene Syntheseprogramme benutzt. Das Syntheseprogramm „Cyc04 user“, welches bei der Darstellung der 21-meren Sequenzen Verwendung fand, wurde bereits von Charubala^[364] bei Oligonucleotid-Synthesen unter Einbau des 3-Methyl-2-N-(2-phenylethyl)-isoxanthopterin-Nucleosids benutzt. Im Gegensatz zu üblichen DNA-Syntheseprogrammen besitzt dieser Cycus einen zweiten Kondensationsschritt zur Steigerung der Kondensationsausbeute. Als zweiter Cycus wurde bei Testsynthesen das Programm „Cyc10 user“ verwendet. Diese Routine entspricht im Prinzip dem „Cyc04 user“, doch fehlt der zweite Kondensationsschritt und sowohl der Detritylierungs- als auch der

Oxidationsschritt ist deutlich länger. Beide Programme waren bereits am Gerät eingespeichert und wurden nicht weiter modifiziert.

Die Tabellen 10.3 und 10.4 zeigen im Kurzschemata die wichtigsten Eckdaten dieser beiden Cyclen, ausführlich sind beide im Experimentellen Teil beschrieben.

Synthese-Schritt	Reagenzien	Dauer [sec.]
Detritylierung	TCA / CH ₂ Cl ₂	83
Kondensation	Phosphitamid (0,1M) / Tetrazol (0,5M)	72,5 + 70,5 inkl. 2 * 50 wait
Capping	Ac ₂ O / Lutidin / N-Methylimidazol in THF	28 inkl. wait (20)
Oxidation	Iod / Pyridin / Wasser in THF	36 inkl. wait (15)
Gesamtdauer pro Cyclus inklusive aller Waschschrte etc.		584,5

Tab.10.3 : Kurzschemata des Syntheseprogramms Cyc04 user

Synthese-Schritt	Reagenzien	Dauer [sec.]
Detritylierung	TCA / CH ₂ Cl ₂	141
Kondensation	Phosphitamid (0,1M) / Tetrazol (0,5M)	59 inkl. wait (50)
Oxidation	Iod / Pyridin / Wasser in THF	120 inkl. wait (108)
Capping	Ac ₂ O / Lutidin / N-Methylimidazol in THF	28 inkl. wait (15)
Gesamtdauer pro Cyclus inklusive aller Waschschrte etc.		671,5

Tab.10.4 : Kurzschemata des Syntheseprogramms Cyc10 user

Im Anschluß an die erfolgte Oligonucleotid-Synthese findet nach der NPE-/NPEOC-Strategie die Abspaltung der β -eliminierbaren Schutzgruppen vom Oligomer statt. Die Entschützungs-routine „small scale DBU“ behandelt das noch trägergebundene Oligonucleotid für ca 11 h mit der DBU-Lösung. In der Regel wurde dazu 1M DBU in Acetonitril verwendet.

Als letztes Programm wird eine Routine zur Trägerabspaltung durchlaufen. Dabei wird das Trägermaterial viermal für 15 min mit konzentriertem Ammoniak behandelt. Die Abspaltungslösung werden zum Sammelgefäß (collective vial) abgeleitet.

10.6. Analytik

Nachdem die Oligonucleotid-Synthese beendet ist, erfolgt die Reinheitsbestimmung des erhaltenen Produktes. Neben elektrophoretischen und massenspektrometrischen Verfahren ist die am häufigsten angewandte Methode ist die High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Zur Detektion nach der Auftrennung werden dabei UV-Detektoren bei einer

Wellenlänge von 260 nm verwendet, bei den pteridinmodifizierten Oligonucleotiden kann auch bei 360 nm detektiert werden, wobei jedoch Nebenprodukte ohne Isoxanthopterin-Einbau unentdeckt bleiben.

Bei den durchgeführten Oligonucleotidsynthesen erfolgte die Qualitätskontrolle in drei Schritten: der Bestimmung von Kondensationsausbeuten und Ausbeute an Oligomer, sowie die Aufnahme eines HPL-Chromatogramms.

10.6.1. Bestimmung der Kondensations-Ausbeute

Am ABI 392 B erfolgt die UV-spektroskopische Bestimmung des Absorptionswertes der Abspaltlösung aus der Detritylierung bei 498 nm automatisch am Gerät durch einen internen UV-Detektor. Ein gemessener Wert wird mit dem jeweils zuvor erhaltenen verglichen und als relative Kondensationsausbeute für den Syntheseschritt am Ende der Synthese aufgelistet.

Da die Werte allgemein mit größeren Meßfehlern behaftet sind, ergibt erst der über alle Schritte gemittelte Wert einen einigermaßen zuverlässigen ersten Hinweis auf die Qualität der Synthese.

10.6.2. Bestimmung der Oligonucleotid-Ausbeute

Zur Ausbeutebestimmung wird ein Aliquot der Abspaltlösung aus dem collective vial entnommen und mit Wasser auf 1 ml verdünnt. Von dieser Lösung wird in einer 1 ml Küvette ein UV-Spektrum aufgenommen. Aus der Absorption oder optischen Dichte bei 260 nm (oD_{260}) kann auf den Gesamtgehalt der Abspaltlösung an Oligonucleotid geschlossen werden. Die erhaltene Stoffmenge kann näherungsweise nach der Lambert-Beer'schen Gleichung wie folgt berechnet werden :

$$n \text{ [mol]} = \frac{V \text{ [l]} * A_{260\text{nm}}}{B * \epsilon_{260\text{nm}} \text{ [l/(mol*cm)]} * d \text{ [cm]}}$$

n = Stoffmenge, V = Volumen
A = Absorption, d=Schichtdicke
B=Anzahl der Basen im Oligomer
 ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

Für die natürlichen Basen wird der Wert für ϵ dabei näherungsweise auf 10^4 gesetzt. Die Hypochromizität ist in dieser Formel nicht berücksichtigt.

10.6.3. Reversed-Phase-HPLC

Die HPL-chromatographischen Untersuchungen wurden an einer Anlage von Merck-Hitachi auf LiChrospher 100 RP-18 Säulen durchgeführt. Als Elutionssystem diente ein Gradient aus 0,1M Triethylammoniumacetat-Puffer (TEAC) und Acetonitril, wobei Mengen zwischen 0,2 und 0,4 oD₂₆₀ an Oligonucleotid-Rohprodukt untersucht wurden.

Der Ionenpaar-Reversed-Phase-HPLC liegt folgendes Prinzip zugrunde: die Ammoniumionen der mobilen Phase (TEAC-Puffer) bilden mit den Phosphodiesteranionen des Oligonucleotids neutrale, hydrophobe Ionenpaare aus. Auf dem RP-18-Material (mit C₁₈-Alkylketten modifiziertes Kieselgel) lassen sich so Oligomeren-Gemische nach ihrer Länge auftrennen. Dabei werden kürzere Sequenzen, also die weniger hydrophoben, verglichen mit längeren Oligonucleotiden früher eluiert.