Der 2-Trichlormethyl-2-propyl – Rest als Phosphatschutz in der Oligonukleotidsynthese

The 2-Trichloromethyl-2-propyl Group as a Protecting Group in Oligonucleotide Synthesis

Ruth G. K. Schneiderwind-Stöcklein und Ivar Ugi*

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

Z. Naturforsch. **39b**, 968–971 (1984); eingegangen am 21. Februar 1983

Oligonucleotide Synthesis, Protecting Group, Phosphite Triester Approach,
Chloreton Derivatives

The synthesis of pure TCB-dichlorophosphite and di-TCB-monochlorophosphite are described, as well as the formation of the di-triazolide from TCB-dichlorophosphite and its use in the preparation of a dinucleotide derivative.

Einleitung

Mit der zunehmenden Verwendung der Phosphotriester-Methode [1] in der Oligonukleotidsynthese geht die Entwicklung einer Vielzahl phosphorylierender Reagentien mit unterschiedlichen Phosphat-schutzgruppen einher; β -halogenierte Alkylmono- und -dichlorphosphate [2] erfreuen sich dabei steigender Beliebtheit.

Spezielle Vorteile zeigte in neuerer Zeit der Einsatz der 2-Trichlormethyl-2-propyl-Gruppe (TCB) zum Schutz der internukleotidischen Phosphit/Phosphat-Bindung [3, 4]. Die resultierenden TCB-Triester-Derivate überstehen alle Reaktionsbedingungen der Oligonukleotidsynthese und können aufgrund ihrer Stabilität leicht durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt werden. Der TCB-Phosphatschutz ist mittels Cobalt-(I)-Phthalocyanin-Anion selektiv unter milden Bedingungen abspaltbar [3]. In puncto Deblockierung ist die TCB-Gruppe zu den anderen Schutzgruppen „orthogonal“.

Wir beschrieben bereits Bis-(2-Trichlormethyl-2-propyl)monochlorphosphat als selektives Reagens für Phosphorylierung und Schutz der 5'OH-Gruppe von Nukleosid-Derivaten [3], und Letsinger *et al.* [4] verwendeten 2-Trichlormethyl-2-propyl-dichlorphosphit zur Darstellung längerer Oligonukleotideinheiten mit der Phosphittriester-Festphasen-Methode.

Die Synthese der Chloretonmono- und dichlorphosphit-Derivate wurde zwar schon von verschiedenen Autoren beschrieben, doch führten alle bisher verwendeten Reaktionsbedingungen nur zu Estergemischen.

Gerrard [5] erwähnte 1944 erstmals die Reaktion von PCl_3 mit Hydroxyverbindungen zu den Gemischen ROPCl_2 , $(\text{RO})_2\text{PCl}$ und $(\text{RO})_3\text{P}$, die er in späteren Arbeiten (auch am Beispiel des Chloretons) genauer beschrieb.

1957 griffen Abramov und Khairullin [6] die Arbeiten von Garrard *et al.* auf und wiederholten die Darstellung von $(\text{RO})_2\text{PCl}$ und ROPCl_2 ($\text{R} = \text{TCB}$) in Ether und Pyridin.

Kellner und Ugi [7] synthetisierten ROPCl_2 und $(\text{RO})_2\text{PCl}$ ($\text{R} = \text{TCB}$) ebenfalls als Estergemische und stellten die Chlorphosphate $(\text{TCBO})_2\text{POCl}$ und TCBOPOCl_2 als Phosphorylierungs-Reagentien vor.

Ergebnisse

Die von uns gewählte Modifikation der bekannten Literaturvorschriften von Gerrard *et al.* [5], Abramov und Khairullin [6] sowie Kellner und Ugi [7] ergab die Phosphorigsäureester- und -diesterhalogenide **3** und **4** (Schema 1) nicht als Gemisch, sondern jeweils als einheitliche Produkte in sehr guter Ausbeute; **4** konnte dabei erstmals kristallin ($F_p = 46^\circ\text{C}$) isoliert werden [3].

Tab. I enthält die zur Reindarstellung der Phosphite **3** und **4** erforderlichen Reaktionsbedingungen.

Bei Verwendung von Pentan als Lösungsmittel, kann das bei der Reaktion entstehende Pyridin-Hydrochlorid ausgefällt und abfiltriert werden.

* Sonderdruckerfordernungen an Prof. Dr. Ivar Ugi.

Abkürzungen: TCB = 2,2,2-Trichlor-*tert*-butyl,
2-Trichlormethyl-2-propyl;
Py = Pyridin; Temp. = Temperatur;
Ausb. = Ausbeute.

Schema 1

Tab. I. Reaktionsbedingungen für die Reindarstellung der Phosphite **3** und **4**.

Phosphit	Chloreton eq	PCl ₃ eq	Pyridin eq	Temp. [°C]	Zeit [h]	Ausb. [%]
3	1 ^a	4 ^b	1 ^a	-10 ^c 21 Rückfluß	2 24 2	97 ^e 92 ^f
4	2 ^b	1 ^d	2 ^b	0 ^c 21 Rückfluß	2 24 2	89 ^e 71 ^f

^a = Zeitlich abgestimmtes, gleichzeitiges Zutropfen; ^b = vorliegen; ^c = Temperatur während des Zutropfens; ^d zu-tropfen; ^e = Rohausbeute; ^f = Ausbeute nach Reinigung.

Die, für die Oxidation der Phosphite **3** und **4** zu den Phosphaten **5** und **6** zur Auswahl stehenden Oxidationsmittel (u. a. N₂O₄, Luft, O₂, (Diacetoxyiod)-benzol) sind von Kellner und Ugi [7] bereits eingehend beschrieben worden. Das für **3** und **4** jeweils günstigste oxidierende Reagens wird im experimentellen Teil nochmals angegeben (**3**→**5**: O₂, **4**→**6**: (Diacetoxyiod)benzol). Im Falle einer Oxidation ist eine Reinigung der Phosphite mittels Destillation i. Vak. nicht erforderlich. Laut spektroskopischer Analyse (³¹P-, ¹H-NMR) fallen **3** und **4** jeweils als einheitliche Produkte an.

2-Trichlormethyl-2-propyl-dichlorphosphit **3** eignet sich wegen seiner, durch sterische Hinderung bedingten, relativ guten Selektivität in der Reaktion mit 5'-OH-geschützten Nukleosiden und der großen Stabilität der Phosphittriestern-Zwischenstufen bestens für den Einsatz bei der Oligonukleotidsynthese.

Das von Letsinger *et al.* [4] bei Festphasen-Synthesen bereits verwendete 2-Trichlormethyl-2-propyl-dichlorphosphit **3** reagiert bei sehr niedrigen Temperaturen (-78 °C) sofort mit 3'-OH-ungeschützten Nukleosid-Derivaten zu **8** (Schema 2). Der weitere Umsatz von **8** mit einem 5'-OH-ungeschützten Nukleosid **9** ergibt neben der erwünschten 3'/5'-Verknüpfung (**10** bzw. nach Oxidation **11**) auch 3'/3'-verknüpftes Dinukleotid.

Wir haben nun beobachtet, daß bei Ersatz der Chloratome durch 1.2.4-Triazol [8] die Selektivität der Phosphitylierung vorteilhaft erhöht wird. Die Tendenz zur 3'/3'-Verknüpfung ist mit dem Triazolid **3b** geringer.

Das Triazolid **3b** wird bei 0 °C in situ hergestellt und sukzessive mit äquimolaren Mengen der 5'-OH- und 3'-OH-ungeschützten Nukleoside versetzt. Nach Oxidation mit Jod in H₂O/Pyridin/THF und Reinigung des Rohprodukts durch Säulenchromatographie an Kieselgel erhält man das 3'/5'-Phosphat **11** in guter Ausbeute.

Schema 2

Die Substitution der Chloratome von **3** und **5** mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) [9] ergab keine zufriedenstellenden Ergebnisse zur präparativen Darstellung 3'5'-verknüpfter Dinukleotide.

Experimenteller Teil

2-Trichlormethyl-2-propyl-dichlorphosphit (**3**)

Unter N₂ werden bei –10 °C gleichzeitig 72,5 ml (0,9 mol) Pyridin und 160,5 g (0,9 mol) wasserfreies Chloreton in 250 ml Pentan (Zugabe von Chloreton ca. 4× schneller als Pyridin) in 325 ml (3,61 mol) PCl₃ in 250 ml Pentan eingetroppt. Man rührt 1 d bei 21 °C und 2 h unter Rückfluß nach. Pyridin-Hydrochlorid wird abfiltriert, Pentan und überschüssiges PCl₃ entfernt und **3** durch Destillation i. Vak. gereinigt. Man erhält 231 g (92% d. Th.) farbloses Öl.

C₄H₆Cl₅OP **3**; Sdp._{0,2} = 66 °C; δ(³¹P, C₆D₆) = 192–193 °C; δ(¹H, C₆D₆) = 1,7 ppm, d; δ(¹H, CDCl₃) = 1,8 ppm, d; IR (Film): ν(CH) 3000, 2960 w; δ(CH₃–C) 1370, 1390 m; δ(P–O–Alkyl) 1000, 1015 s; ν(C–Cl) 800 s cm^{–1}.

Bis(2-Trichlormethyl-2-propyl)-monochlorphosphit (**4**)

Unter N₂ werden bei 0 °C 177,5 g (1 mol) wasserfreies Chloreton und 80,5 ml (1 mol) Pyridin in 300 ml Pentan mit 43,5 ml (0,5 mol) PCl₃ in 150 ml Pentan versetzt, 1 d bei 21 °C und 2 h unter Rückfluß nachgerührt. Pyridin-Hydrochlorid wird abfiltriert, Pentan entfernt und das Rohprodukt i. Vak. destilliert. Man erhält 150 g (71% d. Th.) farblosen Feststoff.

C₈H₁₂Cl₇O₂P **4**; Schmp. = 46 °C; Sdp._{0,015} = 134 °C.
Gef. C 22,90 H 3,01,
Ber. C 22,91 H 2,89.

δ(³¹P, C₆D₆) = 165 ppm; δ(¹H, C₆D₆) = 1,85 ppm, s; δ(¹H, CDCl₃) = 1,95 ppm, s; IR (KBr): ν(CH) 3000, 2940 w; δ(CH₃–C) 1390, 1370 m; 1265 s; 1150 s; δ(P–O–Alkyl) 1030, 975 s; ν(C–Cl) 800 s cm^{–1}.

2-Trichlormethyl-2-propyl-dichlorphosphat (**5**)

In eine Lösung von 20 g (72 mmol) **3** in 50 ml CCl₄ wird bei 40 °C im Überschuß trockener Sauerstoff eingeleitet. Nach 5 h wird CCl₄ entfernt und das Rohprodukt i. Vak. destilliert. Man erhält 20 g (95% d. Th.) farblosen Feststoff.

C₄H₆Cl₅O₂P **5**; Schmp. = 42 °C; Sdp._{0,5} = 54–55 °C
Gef. C 16,48 H 1,97,
Ber. C 16,32 H 2,06.

δ(³¹P, C₆D₆) = (0,1–0,8) ppm; δ(¹H, CDCl₃) = 2,1 ppm, s; IR (KBr): ν(CH) 2995, 2945 w; δ(CH₃–C) 1390, 1370 w; δ(P–O–Alkyl) 1010 s; ν(C–Cl) 800 s cm^{–1}.

Bis(2-Trichlormethyl-2-propyl)-monochlorphosphat (**6**)

Unter Lichtausschluß und N₂ wird eine gekühlte Lösung von 109 g (259 mmol) **4** in 200 ml CHCl₃ zu einer auf –15 °C gekühlten Suspension von 91 g (294 mmol) (Diacetoxyiod)benzol in 500 ml CHCl₃ getropft. Man rührt 2 d bei 21 °C nach. Nach Einengen der Lösung und Übersichten des Rückstandes mit Pentan erhält man 74 g (65% d. Th.) kristallinen farblosen Feststoff **6**.

C₈H₁₂Cl₇O₃P **6**; Schmp. = 81–82 °C
Gef. C 22,32 H 2,89,
Ber. C 22,07 H 2,78.

δ(³¹P, C₆D₆) = –(7,8–7,9) ppm; δ(¹H, CDCl₃) = 2,0 ppm, s; IR (KBr): ν(CH) 3000, 2955 w; δ(CH₃–C) 1390, 1370 m; δ(P–O–Alkyl) 1020 s; ν(C–Cl) 800 s cm^{–1}.

(TCB)(5'-O-Tritylthymidinyl-3')(3'-O-acetylthymidinyl-5')-phosphat (**11**)

0,28 g (4 mmol) 1.2.4-Triazol in 2,5 ml THF/Pyridin (2:0,5, v/v) und 0,2 ml (1 mmol) **3** werden unter N₂ und Eiskühlung 10 min gerührt. Man tropft 0,48 g (1 mmol) 5'-O-Tritylthymidin in 2 ml THF und nach 10 min 0,28 g (1 mmol) 3'-O-Acetylthymidin in 2 ml THF bei 0 °C zu. Nach 1 h oxidiert man mit 0,25 g (1 mmol) Iod in 7,5 ml THF/H₂O (2:1, v/v) und 0,08 ml (2 mmol) Pyridin. Nach Einengen des Lösungsmittels wird der Rückstand mit 80 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und mit 80 ml H₂O und Natriumbisulfit-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet (Na₂SO₄) und eingeeengt. Säulenchromatographie an Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fa. Merck) mit Essigester ergibt 0,68 g (69%) 3'5'-Dinukleotid **11** (Rohausbeute 83%).

C₄₅H₄₈Cl₃N₄O₁₃P **11**, Zp. = 118–120 °C
Gef. C 53,27 H 5,00 N 5,66,
Ber. C 54,59 H 4,89 N 5,66.

δ(³¹P, CDCl₃) = –8,6 ppm, –8,9 ppm; δ(¹H, CDCl₃) = 1,4 ppm (s, 3H, Thy-CH₃); 1,8 ppm (s, 3H, Acetyl); 1,9 ppm (s, 6H, TCB); 2,1 ppm (s, 3H, Thy-CH₃); 2,2, 2,4, 2,6, 3,4, 4,1, 4,3, 5,2, 6,3–6,4 ppm (multipletts, 2×7 H, Ribose); 7,3–7,4 ppm (m, 15H, Trityl); 7,5 ppm (s, 2×1H, N–CH–C); 9,6, 9,7 ppm (s, 2×1H, CO–NH–CO); IR (KBr): ν(NH) 3420, 3280 w;

$\nu(\text{Aromat})$ 3050 w; $\nu(\text{CH})$ 2960 w; $\nu(\text{C=O})$ 1690 s;
1270 m; 1230 m; $\delta(\text{P-O-Alkyl})$ 1015 m; $\nu(\text{C-Cl})$
800 w cm^{-1} .

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 145) und dem Fonds der chemischen Industrie danken wir für die Förderung dieser Untersuchungen.

-
- [1] C. B. Reese, *Tetrahedron* **34**, 3143 (1978);
A. Rosenthal und D. Cech, *Z. Chem.* **23**, 317 (1983).
- [2] F. Eckstein und I. Rizk, *Chem. Ber.* **102**, 2362 (1969);
J. H. van Boom, R. Crea, W. C. Luyten und A. B. Vink, *Tetrahedron Lett.* **32**, 2779 (1975);
R. L. Letsinger und W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 3655 (1976);
K. K. Ogilvie, S. L. Beaucage, N. Theriault und D. W. Entwistle, *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 1277 (1977);
J. Imai und P. F. Torrence, *J. Org. Chem.* **46**, 4015 (1981).
- [3] H. A. Kellner, R. G. K. Schneiderwind, H. Eckert und I. K. Ugi, *Angew. Chem.* **93**, 581 (1981); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **20**, 577 (1981).
- [4] R. L. Letsinger, E. P. Groody und T. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6805 (1982);
R. L. Letsinger, E. P. Groody, N. Lander und T. Tanaka, *Tetrahedron* **40**, 137 (1984).
- [5] W. Gerrard, *J. Chem. Soc.* **1944**, 85;
W. Gerrard und P. L. Wyvill, *Research (London)* **2**, 536 (1949);
W. Gerrard, M. J. D. Isaacs, G. Machell, K. B. Smith und P. L. Wyvill, *J. Chem. Soc.* **1953**, 1920;
W. Gerrard, W. J. Green und R. J. Phillips, *J. Chem. Soc.* **1954**, 1148.
- [6] V. S. Abramov und V. K. Khairullin, *J. Gen. Chem. USSR* **27**, 501 (1957).
- [7] H. A. Kellner und I. Ugi, *Z. Naturforsch.* **34b**, 1159 (1979).
- [8] J. L. Fourrey und D. J. Shire, *Tetrahedron Lett.* **22**, 729 (1981).
- [9] J. E. Marugg, G. A. van der Marel, E. de Vroom, D. Bosch und J. H. van Boom, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **101**, 411 (1982);
J. E. Marugg, M. Tromp, P. Jhurani, C. F. Hoyng, G. A. van der Marel und J. H. van Boom, *Tetrahedron* **40**, 73 (1984).