

LITHIATION DES DERIVES SILYLES DU DESOXY-2'-URIDINE MONO-PHOSPHATE-5' (DUMP) ET DU BROMO-5-DESOXY-2'-URIDINE MONO-PHOSPHATE-5' (BR-5 DUMP), PREPARATION DE THYMIDINE (METHYL  $^{14}\text{C}$ ) -MONOPHOSPHATE-5' (TMP).

L. Pichat, J. Godbillon et M. Herbert.

Service des Molécules Marquées- C.E.N. Saclay -

B.P. n°2 - 91 190 - Gif-sur-Yvette - France

Received on May 9, 1973

SUMMARY

*6-methyl-deoxyuridine-5'-monophosphate is the main product of the methylation of the lithium compound made from trimethylsilyl -3'-O-trimethylsilyl -3'-deoxyuridylate ( 24% yield based on  $^{14}\text{CH}_3\text{I}$  ).Thymidine-5'-monophosphate may be prepared ( 30% yield ) from the corresponding 5- bromo nucleotide.*

RESUME

La méthyl-6-désoxyuridine monophosphate-5' est le produit prépondérant de la méthylation du dérivé lithié de l'ester bis (triméthylsilylé) de l'acide O-triméthylsilyl-3'-désoxyuridylique avec un rendement de 24% par rapport à  $^{14}\text{CH}_3\text{I}$ . La thymidine monophosphate-5' (méthyl  $^{14}\text{C}$ ) peut être obtenue avec un rendement de 30% à partir du bromo-5 nucléotide correspondant.

Les nucléosides monophosphates sont préparés essentiellement par phosphorylation des nucléosides correspondants, soit par voie enzymatique (1), soit par voie chimique. Pour ces dernières, les étapes sont nombreuses car la fonction hydroxyle du désoxyribose en 3' doit être protégée sélectivement ( 2, 3, 4, 5, 6 ). Néanmoins, des méthodes de préparation utilisent des nucléosides dont toutes les fonctions hydroxyloles sont libres ( 7, 8 ).

Une autre approche ( 9 ) consistant en la condensation du sel mercurique de la thymine avec le bromure de di-2,3-benzoyl-diphénylphos-

phoryl-5-D-ribofuranosyle donne la thymidine monophosphate-5' avec un rendement global faible.

Il nous a paru intéressant d'étendre la méthode de C-méthylation de dérivés lithiés de dérivés silylés de nucléosides ( 10, 11 ) à la préparation de thymidine monophosphate-5' (TMP).

Pour ce faire, nous avons opposé l'iodure de méthyle  $^{14}\text{C}$  aux lithiens obtenus soit par lithiation directe de TMS désoxy-2'-uridine monophosphate-5' ( 12 ), soit par échange brome lithium sur le TMS bromo-5-désoxy-2'-uridine monophosphate-5' ( 12 ). On pouvait douter, a priori, que la fonction ester phosphorique serait stable vis-à-vis du butyllithium. L'expérience a montré qu'en opérant à basse température la réaction projetée est réalisable.

#### A - Méthylation du lithien de l'ester bis (triméthylsilyl) de l'acide O - triméthylsilyl - 3' - désoxy - 2' uridylique (TMS - dUMP).

Les essais conduits dans les conditions du tableau 1 nous ont permis d'isoler avec un rendement de 15% par rapport à  $^{14}\text{CH}_3\text{I}$  un produit ayant même Rf que la TMP mais, dont le spectre U.V. analogue à ceux de l'isothymidine ou de la méthyl-6 uridine ( 10, 11 ) ainsi que l'hydrolyse qui fournit du méthyl-6 uracile, nous conduisent à lui attribuer la structure du méthyl-6-désoxy-2' -uridine monophosphate-5'.

On a isolé aussi de la TMP avec un rendement de 4%. C'est donc le groupement phosphate de bis (triméthylsilyle) en position 5' qui oriente la lithiation vers la position 6 aux dépens de la position 5, puisque dans la méthylation du lithien dérivé de la désoxy-2'-uridine silylée, le composé méthylié en position 5 se forme préférentiellement ( 10 ). Ce résultat est confirmé par le spectre de RMN de l'acide désoxy-2'-uridylique obtenu par deutériolyse du lithien. Il indique 20% de deutérium en position 6 et l'absence totale de cet isotope en position 5. Il y a donc bien échange H-Li préférentiellement en position 6.

Ceci peut-être s'expliquer par la conformation de la molécule de dUMP silylée. Dans la plupart des nucléotides, la base a l'orientation anti par rapport au sucre ( 13 ), c'est-à-dire que le carbone en 6 de la base est au-dessus du plan moyen du ribose ou désoxyribose (dans l'orientation inverse: syn, le groupement C=O en 2 est au-dessus de ce plan moyen). De plus, dans les nucléotides, la liaison O-5'-P occupe une po-

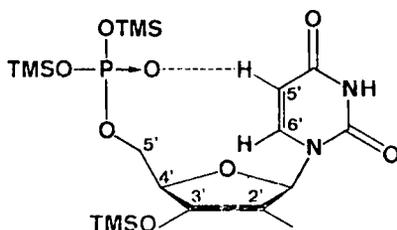
TABLEAU I

Lithiation puis méthylation de l'ester bis (triméthylsilyle de l'acide O-triméthylsilyl-3'-désoxy-2' uridylique (TMS-dUMP).

Essais	TMS - dUMP mM	n-BuLi mM	$\text{I}^*\text{CH}_3$ mM	Température de lithiation	Température de méthylation	% fixé
a	2,6	3,6	1,27	-45° à - 47°	- 60° à - 65°	28
b	2,6	4,60	0,67	-35° à - 45°	- 55° à - 60°	73
Solvant : THF + 8 % HMPT						

sition trans par rapport à ce plan assurant ainsi la forme la plus développée pour la molécule ( 13 ).

L'examen d'un modèle moléculaire montre que, compte tenu des encombrements stériques des groupements  $-\text{SiMe}_3$  la molécule peut-être représentée sous la forme suivante:



dans laquelle existerait entre l'oxygène du phosphate et le proton en 5 une liaison hydrogène rendant l'attaque du n-BuLi plus difficile en cette position et favorisant ainsi l'échange H-Li en position 6.

Ces résultats nous ont amené à étudier la lithiation du dérivé silylé de la bromo-5-désoxy-2'-uridine monophosphate-5'. L'échange Br-Li se faisant plus facilement que l'échange H-Li, la lithiation aura lieu essentiellement en position 5. La thymidine monophosphate-5' sera le produit principal de l'alcoylation.

B - Lithiation de l'ester bis ( triméthylsilyle ) de l'acide O - triméthylsilyl - 3' - bromo - 5 - désoxy - 2' - uridylique ( TMS - BrdUMP ).

La deutériolyse de ce lithien a montré que l'échange Br-Li se fait avec un rendement de 40% et qu'il a eu lithiation préférentielle en position 5. Néanmoins, il y a simultanément lithiation de la position 6 comme le montre la formation simultanée de 8 à 9% de Me-6-dUMP lors de la méthylation du lithien. Par exemple, l'essai a du tableau II donne par hydrolyse un mélange de thymine (91%) et méthyl-6-uracile (9%) caractérisés par

chromatographie sur papier. On voit sur ce tableau que le THF en présence de 8% de HMPT n'est pas le solvant le plus approprié, à la différence des nucléosides précédemment étudiés ( 10, 11 ). Dans l'essai a, le mélange réactionnel contient environ 50% de produits radioactifs autres que la TMP + Me-6-dUMP. Le diméthoxy-1, 2éthane ("monoglyme") permet d'obtenir une méthylation beaucoup plus sélective (essai f, h ).

Les conditions opératoires mises au point sont assez satisfaisantes pour que l'on puisse utiliser la méthode pour une préparation de TMP méthyl-<sup>14</sup>C, de haute activité spécifique. Le Me-6 dUMP formé simultanément est séparable par chromatographie sur colonne de Dowex 1x8 forme OH<sup>-</sup> mais nous n'avons pas trouvé de procédé pratique pour la séparation du désoxy-uridine monophosphate inactif résultant de l'hydrolyse de l'excès de lithien intermédiaire.

TABLEAU II

Lithiation puis méthylation de l'ester bis (triméthylsilyle) de l'acide O-triméthylsilyl-3'-bromo-5-désoxy-2' uridylique (TMS-Br dUMP). Influence du solvant.

Essais (*)	Solvant <sup>3</sup> (volume cm <sup>3</sup> )	TMS-Br dUMP (mM)	$^{14}\text{C}_3$ (mM) température de méthylation	$^{14}\text{C}_3$ % réagi	(par rapport à $^{14}\text{C}_3$ ) %TMP + Me-6-dUMP
a	THF (30) 8 % HMPT	2	0,80 - 53° à - 60°	33	17
b	THF (90) 8 % HMPT	2	0,8 - 57° à - 65°	32	13
c	THF (30) 8 % HMPT	2	0,84 - 40° à - 45°	45	18
d	diMeOéthane (30)	2	0,86 - 60° à - 65°	18	16-17
e	diMeOéthane (30)	1,8	0,36 - 60° à - 65°	18	10-11
f	diMeOéthane (30)	2	0,42 - 60° à - 65°	50	35
g	diMeOéthane (20)	0,8	0,22 - 60° à - 65°	26-27	20-21
h	diMeOéthane (20)	0,8	0,18 - 60° à - 65°	45	29

(\*) Lithiation à - 45° dans tous ces essais - Rapport  
n-BuLi/TMS-Br dUMP = 1,8.

PARTIE EXPERIMENTALE.

TABLEAU III

Données chromatographiques

	Rf x 100					
	Solvants					
	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>	<u>e</u>	<u>f</u>
Bromo-5-désoxyuridine-5'-monophosphate	35° 39	07°				34
Désoxyuridine-5'-monophosphate	37° 35	01	31° 53	23	37	30
Méthyl-6-désoxyuridine-5'-monophosphate	30 41°	01	63 40	28	43	35
Thymidine-5'-monophosphate	30	01	63	28	43	35

a = n-BuOH : 50, AcOH : 25, H<sub>2</sub>O : 25.  
b = CH<sub>3</sub>CN : 80, AcOH : 5, H<sub>2</sub>O : 15.  
c = t-AmOH : 30, HCO<sub>2</sub>H : 20, H<sub>2</sub>O : 10.  
d = EtOH : 70, AcONH<sub>4</sub> 1 M pH 7,5 : 30.  
e = Ac. isobutyrique : 66, NH<sub>4</sub>OH : 1, H<sub>2</sub>O : 33.  
f = t-BuOH : 40, MeEtCO : 30, HCO<sub>2</sub>H : 15, H<sub>2</sub>O : 15.

Papier Whatman n° 1 - Chromatographies descendantes.  
 ° CMC : Couches minces cellulose.

Méthyl <sup>14</sup>C - 6 - désoxy - 2' - uridine monophosphate - 5'.

Dans les conditions rapportées pour la préparation de la méthyl-5-uridine (12), on traite 2,6 mM de dérivé TMS du désoxyuridine monophosphate en solution dans 30 cm<sup>3</sup> de THF par 4,6 mM de n-BuLi (2,25 cm<sup>3</sup> hexane + 7,8 cm<sup>3</sup> d'éther anhydre) puis après addition de 3,2 cm<sup>3</sup> de HMPT par 0,67 mM de ICH<sub>3</sub>. Après les traitements habituels, les substances volatiles ont une activité de 0,36 mCi, la solution aqueuse 0,84 mCi. La chromatographie sur colonne de Dowex 1x3 HCO<sub>2</sub>H (Ø = 2,5 cm

, h = 75 cm) (élution : H<sub>2</sub>O : 11., HCO<sub>2</sub>HO, 02N : 1,51., gradient : HCO<sub>2</sub>H2N ( i 1.) dans HCO<sub>2</sub>H1N ( 1 l. ) fournit deux fractions. La première (1,21 mCi contient un produit de même Rf que la TMP par chromatographie sur papier dans les solvants d, g, f, mais dont l'hydrolyse chlorhydrique fournit du méthyl-6 uracile de même Rf qu'un échantillon authentique. Le Me-6 dUMP n'a pas été isolé en quantité suffisante pour une caractérisation plus complète. Le spectre U.V. présente un maximum à 260 mμ comme l'"isothymidine". La deuxième fraction contient 56% de TMP dont l'hydrolyse chlorhydrique donne bien de la Thymine.

Thymidine ( méthyl <sup>14</sup>C ) monophosphate - 5'.

On opère comme précédemment ( 10, 11, 12, ) avec les quantités de réactifs et solvants du tableau II et on obtient les résultats qui y sont consignés.

BIBLIOGRAPHIE.

- 1 L. BAUGNET-MATHIEU, R. GOUTIER, M. SEMAL.  
J. Label. Compounds, 1966, II 77.
- 2 A.M. MICHELSON.  
The chemistry of nucleosides and nucleotides.  
Academic Press, New York, 1963, P. 128.
- 3 G.M. TENER.  
J. Amer. Chem. Soc., 1961, 83, 159.
- 4 G. WEIMANN, H.G. KHRANA.  
J. Amer. Chem. Soc., 1962, 84, 4329.
- 5 F. ECKSTEIN.  
Angew. Chem. Int. Edit., 1965, 4, 876.
- 6 I. KH. FELDMAN, A.A. GINESINA, I.M. NUROVA, B.O. KRAIZ.  
Chem. Abstr., 1967, 66, 65801 u.
- 7 O. MITSUNOBU, K. KATO, J. KIMURA.  
J. Amer. Chem. Soc., 1969, 91, 6510.
- 8 M. YOSHIKAWA, T. KATO, T. TAKENISHI.  
Bull. Chem. Soc. Jap., 1969, 42, 3505.
- 9 T. UKITA, H. HAYATSU.  
J. Amer. Chem. Soc., 1962, 84, 1879.

- 10 L. PICHAT, B. MASSE, J. DESCHAMPS, Ph. DUFAY.  
Bull. Soc. Chim., 1971, p. 2102.
- 11 L. PICHAT, J. GODBILLON, M. HERBERT.  
Bull. Soc. Chim., 1973, à paraître.
- 12 L. PICHAT, J. GODBILLON, M. HERBERT.  
Bull. Soc. Chim., 1973, à paraître.
- 13 N.N. PREOBRAZHENSKAYA, Z.A. SHABAROVA.  
Uspekhi Khimi ( Russian Chem. Rev. ), 1969, 38, 111.