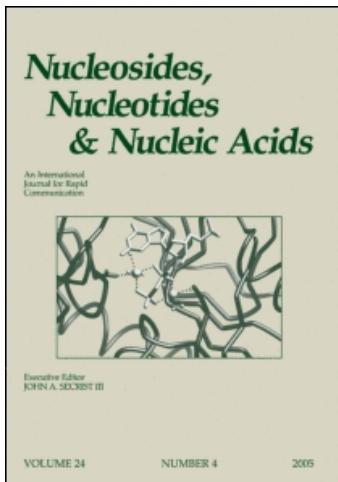


This article was downloaded by:
On: 27 January 2011
Access details: Access Details: Free Access
Publisher Taylor & Francis
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597286>

Synthese d'Oligodesoxyribonucleotides sur Support de Gel de Silice par la Methode au Phosphotriester

J. Ben Hattar^a; B. Rayner^a; J. -L. Imbach^a

^a Laboratoire de Chimie Bio-Organique, ERA n° 948 du CNRS Université des Sciences et Techniques du Languedoc, France

To cite this Article: Hattar, J. Ben , Rayner, B. and Imbach, J. -L.(1982) 'Synthese d'Oligodesoxyribonucleotides sur Support de Gel de Silice par la Methode au Phosphotriester', Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 1: 3, 289 — 295

To link to this Article: DOI: 10.1080/07328318208078842

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/07328318208078842>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

SYNTHESE D'OLIGODESOXYRIBONUCLEOTIDES
SUR SUPPORT DE GEL DE SILICE PAR LA METHODE AU PHOSPHOTRIESTER

J. Ben Hattar, B. Rayner et J.-L. Imbach⁺

Laboratoire de Chimie Bio-Organique, ERA n° 948 du CNRS
Université des Sciences et Techniques du Languedoc,
Place Eugène-Bataillon,
34060 Montpellier Cedex, France.

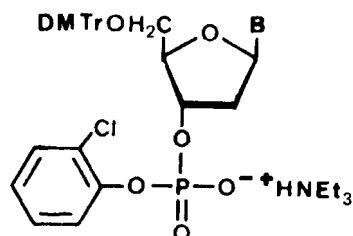
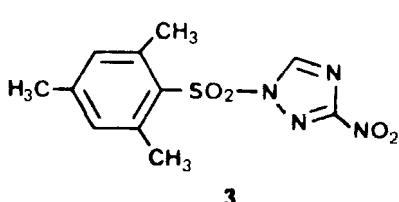
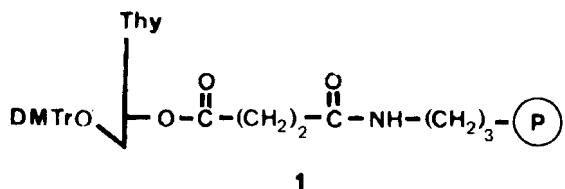
Abstract : A method of oligonucleotide synthesis was developed on a silica gel support by the phosphotriester approach. Using this method, the nonanucleoside octaphosphate dT(pT)₈ was synthesized in 28 % yield.

Différents types de supports organiques insolubles (polystyrène¹, polyacrylmorpholide^{2,3}, polydiméthylacrylamide^{4,5}, cellulose⁶) ont été utilisés avec succès pour la synthèse en phase solide, par la méthode au phosphotriester, d'oligodésoxyribonucléotides. Dans tous ces cas, il s'agit de supports non rigides qui subissent les effets de gonflement dûs aux solvants utilisés et qui nécessitent donc entre chaque étape des lavages répétés. La recherche d'une plus grande efficacité lors de ces synthèses oligonucléotidiques tend vers l'utilisation de supports inertes pouvant être introduits dans une colonne à travers laquelle les solvants et réactifs sont percolés. Au cours de ces dernières années, la silice poreuse s'est révélée être efficace comme support rigide dans l'assemblage d'oligonucléotides par la méthode au phosphite⁷⁻⁹. Très récemment, l'utilisation d'un nouveau support composite, constitué d'une résine polydiméthylacrylamide fixée dans les pores d'une matrice rigide de kieselguhr macroporeux, a été proposée¹⁰ pour la synthèse d'oligodésoxyribonucléotides, via des intermédiaires phosphotriesters.

Jusqu'à maintenant, l'utilisation de silice poreuse comme support pour la synthèse d'oligonucléotides par la méthode au phosphotriester n'a jamais été rapportée¹¹.

Nous avons sélectionné comme matrice la Fractosil 500 (Merck, taille des particules : 0,063-0,125 mm, diamètre moyen des pores : 43 nm, surface 35 à 62 m² g⁻¹). La fonctionnalisation de la matrice a été effectuée selon une méthode déjà décrite dans la littérature^{7,9}. La capacité de μ , basée sur le dosage spectrophotométrique du cation diméthoxytrityle libéré par traitement acide, est de 60 μ moles g⁻¹ (des supports fonctionnalisés avec dC, dA et dG ont été préparés avec une capacité sensiblement égale).

Le support μ (202 mg, 12,1 μ moles) est introduit dans un réacteur équipé d'un injecteur à septum et de deux vannes. Ce système présente une perte de charge négligeable lors de la percolation des différents solvants utilisés. Ceux-ci sont introduits dans le réacteur, sous pression d'azote sec par l'intermédiaire d'une vanne rotative à six voies. Chaque cycle d'elongation (voir Tableau I) de la chaîne oligonucléotidique comprend un traitement avec une solution d'acide trichloroacétique à 10 % dans le dichlorométhane pour enlever le groupement diméthoxytrityle libéré par traitement acide, est de 60 μ moles g⁻¹ (des supports fonctionnalisés avec dC, dA et dG ont été préparés avec une capacité sensiblement égale).



B: Thy, N-benzoyl-6 Ad, N-benzoyl-4 Cy
ou N-isobutyryl-2 Gu

FIG. 1.

TABLEAU I. Cycle de réactions.

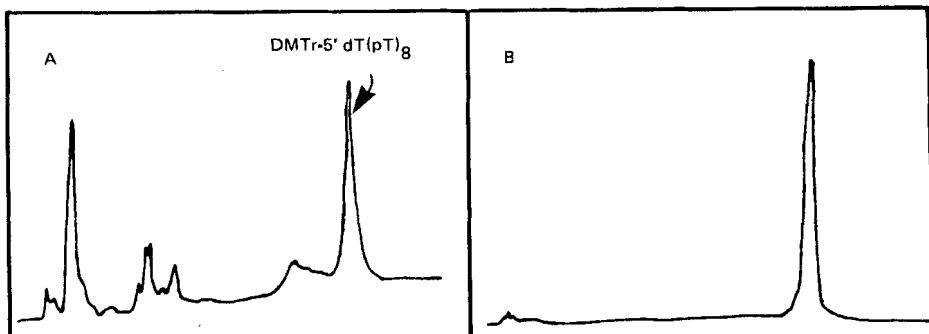
Etape	Solvant ou réactif	Temps d'agitation	Nombre d'opérations
1	CH_2Cl_2	1 mn	5
2	CCl_3COOH 10 % dans CH_2Cl_2	2 mn	2
3	CH_2Cl_2	1 mn	5
4	pyridine	1 mn	5
5	nucléotide 2 (200 μ moles) et MSNT (600 μ moles) dans pyridine (4 ml)	120 mn	1
6	pyridine	1 mn	5
7	Ac_2O 30 % dans pyridine	30 mn	1
8	pyridine	1 mn	5

xytrityle, puis l'injection du mononucléotide approprié 2 (Fig. 1) et de l'agent de condensation : le mésytylène sulfonyl-1 nitro-3 triazole-1,2,4 (MSNT) 3 dans la pyridine. Enfin, un traitement avec une solution d'anhydride acétique dans la pyridine permet de bloquer les groupements hydroxyle-5' qui n'ont pas réagi. Le rendement de chaque étape est estimé par le dosage spectrophotométrique des cations diméthoxytrityle libérés lors du traitement suivant par l'acide trichloroacétique. Le rendement de la dernière étape est estimé par traitement acide d'une partie aliquote du support. Ces résultats sont rassemblés dans le tableau II.

Chaque cycle d'elongation dure trois heures et au terme du nombre requis de cycles, l'oligonucléotide est libéré du support et déprotégé partiellement par traitement avec une solution 0,32 M de nitro-4 syn-benzaldoximate de tétraméthylguanidinium¹³. L'oligonucléotide désiré, portant encore à son extrémité 5' un groupement diméthoxytrityle, est purifié par chromatographie liquide haute performance sur colonne de Partisil B C₁₈ (Fig. 2A). Le pic correspondant à son élution est facilement reconnu de ceux des autres oligonucléotides plus courts et entièrement déprotégés car il est le plus retardé. Enfin, le composé contenu dans la fraction recueillie est traité par un mélange acide acétique-eau (4/1) et la pureté de dT(Tp)₈ est vérifiée par chromatogra-

TABLEAU II. Synthèse de dT(Tp)₈

Longueur de l'oligo-nucléotide lié	(MeO) ₂ TrOH (A ₅₀₄)	Quantité (μmoles)	Rendement par étape(%)	Rendement global(%)
2	600	7,5	59	59
3	474	5,92	79	47
4	456	5,7	96	45
5	403	5,04	88	39
6	356	4,45	88	35
7	341	4,26	96	33
8	306	3,83	90	30
9	284	3,55	92	28

FIG. 2. Analyse HPLC de mélanges réactionnels obtenus lors de la préparation de dT(pT)₈.

A: profil d'élution HPLC du mélange réactionnel brut contenant DMTr-5' dT(pT)₈; l'élution est effectuée selon un gradient linéaire de 8 à 25% d'acétonitrile dans un tampon 0,1M d'acétate d'ammonium. B: profil d'élution HPLC de l'oligonucléotide dT(pT)₈ entièrement déprotégé et purifié; l'élution est effectuée selon un gradient linéaire de 2 à 12% d'acétonitrile dans un tampon 0,1M d'acétate d'ammonium.

phie liquide haute performance sur colonne μBondapack C₁₈ (Fig. 2B). Après purification de 15 % du produit, on a recueilli 12A₂₅₄ d'un composé pur à 95 %. Sa structure a été vérifiée après marquage au ³²P et analyse électrophorétique des produits de digestion partielle par la phosphodiesterase de venin de crotale.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les solvants doivent être purs et anhydres. La pyridine a été distillée sur CaH_2 puis sur chlorure de *p*-toluènesulfonyle et conservée sur tamis moléculaire 4A. Le dichlorométhane a été distillé sur P_2O_5 . L'acide trichloroacétique (Prolabo) a été utilisé sans purification préalable.

La quantité de *O*-diméthoxytrityl-5' désoxynucléoside lié de façon covalente au gel de silice, après chaque cycle d'elongation, a été déterminée par mesure du cation diméthoxytrityle libéré après traitement d'acide. Les effluents provenant des étapes 2 et 3 (Tableau I) sont complétés à 50 ml avec du dichlorométhane. On prélève 2 ml de cette solution que l'on complète à 25 ml avec une solution d'acide trichloroacétique à 10 % dans le dichlorométhane. On mesure l'absorbance à 504 nm de cette solution et la quantité de cation diméthoxytrityle est déterminée en utilisant un coefficient d'extinction moléculaire de 80.000.

Les analyses et purifications HPLC ont été effectuées à l'aide d'un appareillage Waters équipé d'un détecteur à 254 nm, d'un programmeur de gradient, d'un module de compression radiale RCM-100 et d'une colonne analytique Radial-PAK C₁₈ ou d'une colonne de Partisil B C₁₈ (0,78 x 60 cm). L'acetonitrile constitue la phase organique et la phase aqueuse est un tampon d'acétate d'ammonium 0,1M (pH 5,9). Les dérivés désoxynucléoside-N-protégé *o*-chlorophénylphosphates-3' ¹⁴ (sous forme de sels de triéthylammonium) ont été préparés selon la méthode décrite par Reese et col.

Isolation de dT(pT)₈

Une partie (47,2 mg) du gel de silice contenant le désoxynucléotide sous une forme entièrement protégée est traitée par 1 ml d'une solution 0,32M de *p*-nitrobenzaldoximate de tétraméthylguanidinium dans un mélange dioxane-eau (1/1, v/v) à température ambiante pendant 48 hr. Le gel de silice est éliminé par filtration et lavé avec un mélange dioxane-eau (1/1). Les filtrats sont rassemblés et concentrés sous pression réduite. Le résidu est dissous dans de l'eau (1 ml) et la solution est neutralisée (pH~6,5) avec précaution par addition de HCl 0,1N.

Le *O*-diméthoxytrityl-5' dT(pT)₈ est isolé par HPLC sur colonne de Partisil B C₁₈ (voir Fig. IA). L'élution a lieu avec un gradient li-

néaire d'acétonitrile de 8 à 25 % en 15 mn à un débit de 10 ml.mn⁻¹. La fraction appropriée est dessalée sur une colonne de Sephadex G25 et est traitée avec un mélange acide acétique-eau (4/1, v/v) à température ambiante pendant 15 mn. Cette solution est lavée avec du chloroforme puis est neutralisée par addition de bicarbonate de triéthylammonium 1M. L'analyse HPLC du composé obtenu (Fig. IB) indique une pureté spectro-photométrique de 95 %.

Caractérisation de dT(pT)₈

Une partie du composé recueilli a été marquée au ³²P avec du (γ -³²P) et de la T4-kinase¹⁵. L'acide thymidilique marqué au ³²P a été partiellement digéré avec de la phosphodiesterase de venin de Crotalus durissus terrificus. L'analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide a indiqué le nombre attendu de fragments différemment chargés.

REFERENCES

1. K. Miyoshi, R. Arentzen, T. Huang et K. Itakura, Nucleic Acids Research, 8, 5507-5517 (1980).
2. K. Miyoshi, T. Huang et K. Itakura, Nucleic Acids Research, 8, 5491-5505 (1980).
3. K.E. Norris, F. Norris et K. Brunfeldt, Nucleic Acids Research, Symposium Series N° 7, 233-241 (1980).
4. M.L. Duckworth, M.J. Gait, P. Goelet, G. Fang Hong, M. Singh et R.C. Titmas, Nucleic Acids Research, 9, 1691-1706 (1981).
5. A.F. Markham, M.D. Edge, T.C. Atkinson, A.R. Greene, G.R. Heathcliffe, C.R. Newton et D. Scanlon, Nucleic Acids Research, 8, 5193-5205 (1980).
6. R. Crea, T. Horn, Nucleic Acids Research, 8, 2331-2348 (1980) ; T. Horn, M.P. Vasser, M.E. Struble et R. Crea, Nucleic Acids Research, Symposium Series N° 7, 225-232 (1980).
7. M.D. Matteuci et M.H. Caruthers, J. Amer. Chem. Soc., 103, 3185-3191 (1981).
8. F. Chow, T. Kempe et G. Palm, Nucleic Acids Research, 9, 2807-2817 (1981).
9. K.K. Ogilvie et M.J. Nemer, Tetrahedron Letters, 21, 4159-4162 (1980).

10. M.J. Gait, H.W.D. Matthes, M. Singh et R.C. Titmas, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 37-40 (1982).
11. Pendant la rédaction de ce manuscrit, Ikehara et col.¹² ont rapporté l'utilisation d'un support de gel de silice pour la synthèse semi-automatisée d'oligonucléotides par la méthode au phosphotriester.
12. E. Ohtsuka, H. Takashima et M. Ikehara, Tetrahedron Letters, 3081-3084 (1982).
13. C.B. Reese, R.C. Titmas et L. Yau, Tetrahedron Letters, 2727-2730 (1978).
14. J.B. Chattopadhyaya et C.B. Reese, Tetrahedron Letters, 5059-5062 (1979).
15. V. Sgaramella et H.G. Khorana, J. Mol. Biol., 72, 427 (1972).

RECEIVED: October 15, 1982