

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>

Utilisation d'Un Nouveau Type de Support Pour la Synthèse d'Oligonucleotides en Phase Solide

J. -L. Barascut^a; J. Cuartero^a; J. -L. Imbach^a

^a Laboratoire de Chimie Bio-Organique, ERA no 948 du CNRS, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Place Eugène-Bataillon, Montpellier Cedex, France

To cite this Article Barascut, J. -L. , Cuartero, J. and Imbach, J. -L.(1983) 'Utilisation d'Un Nouveau Type de Support Pour la Synthèse d'Oligonucleotides en Phase Solide', *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2: 3, 193 — 202

To link to this Article: DOI: 10.1080/07328318308078854

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/07328318308078854>

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.

UTILISATION D'UN NOUVEAU TYPE DE SUPPORT
POUR LA SYNTHÈSE D'OLIGONUCLEOTIDES EN PHASE SOLIDE

J.-L. Barascut, J. Cuartero 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 new type of support by the phosphotriester approach. Using this method the heptanucleotide dT(pT)₆ was synthesized in 68 % yield.

La synthèse en phase solide est une méthode de choix pour l'obtention rapide d'oligonucléotides. En fait, l'efficacité de cette technique est liée à deux facteurs principaux : la nature du support polymérique et la méthode de couplage des différents nucléotides.

L'utilisation de résines polystyrènes (1), de silices de type varié (2-4) ou de cellulose (5) conduisent généralement soit à des rendements faibles, soit à des résultats non aisément reproductibles, compte tenu de la méthode de couplage envisagée.

L'une des solutions possibles pour améliorer les rendements semble être l'utilisation de supports polymériques polaires qui doivent permettre de réduire les différences de solvation entre la matrice de la résine et la chaîne en croissance (6). De nombreux travaux ont été réalisés dans ce sens, notamment en utilisant des résines polyacrylmorpholides (7-9) ou des supports dérivés des polyacrylamides (10, 11).

Il a été montré (6) que pour être apte à la synthèse oligonucléotidique, les supports polymériques doivent répondre à certaines exigences :

- . minimisation des liaisons hydrogènes intrachâînes par incorporation d'une grande proportion d'amide tertiaire
- . libre perméation de la matrice de la résine par les solvants aprotiques polaires anhydres

- . liaisons interbrins stables vis à vis de tous les réactifs chimiques utilisés en synthèse oligonucléotidique
- . un niveau de fonctionnalisation suffisamment élevé
- . un minimum de manipulations chimiques de la résine après polymérisation

La plupart de ces exigences ont été retenues pour l'obtention de la résine (Fig. 1) (12). Cette résine est préparée par copolymérisation d'un mélange de N-acryloyl-pyrrolidine (monomère de base), de N-acryloyl-diamino-1,6 hexane (agent de fonctionnalisation) et de N,N'-bis acryloyl-diamino-1,2 éthane comme agent de réticulation.

Nous avons testé cette résine en synthèse oligonucléotidique en effectuant la synthèse de l'acide heptathymidilique.

La méthode de couplage que nous avons choisie est la méthode aux phosphotriesters. Cette approche a conduit récemment à des résultats encourageants avec les résines polyacrylmorpholides (13) et en série polyacrylamide (10). En effet, son utilisation est plus simple que celle aux phosphites par suite de la stabilité accrue des réactifs utilisés et, de plus, il n'est pas nécessaire au cours de la synthèse de passer en milieu aqueux. La fonctionnalisation de la résine que nous avons synthétisée est de 0,46 mmole de NH_2 par gramme. La fixation du premier nucléoside sur la résine a été effectuée *via* la position 3' du nucléoside (Fig. 1).

Le diméthoxytrityl-5' déoxynucléoside 2 réagit avec l'anhydride succinique (1,5 équiv.) en présence de diméthylamino-4 pyridine (1,5 équiv.) dans la pyridine anhydre à température ambiante. Le succinate 3 est obtenu avec 90 % de rendement. Le succinate 3 est fixé sur la résine selon deux voies :

tout d'abord par la méthode à l'anhydride symétrique ; en présence de DCC dans le dichlorométhane, 3 conduit à l'anhydride symétrique correspondant 4. Celle-ci réagit dans le DMF avec les groupes amino de la résine libérés par traitement basique du chlorohydrate correspondant par la diisopropyléthylamine, puis neutralisation. La fin de la réaction est observée lorsque le test à la ninhydrine est négatif (14).

Dans un deuxième essai, nous avons fixé le premier nucléoside sur la résine par la méthode à l'ester activé (15). Ainsi, 3 est traité par le pentachloro-phénol (1,1 équiv.) et le DCC (1,5 équiv.) dans le DMF à température ambiante pendant 20 heures. L'ester activé 5 est obtenu

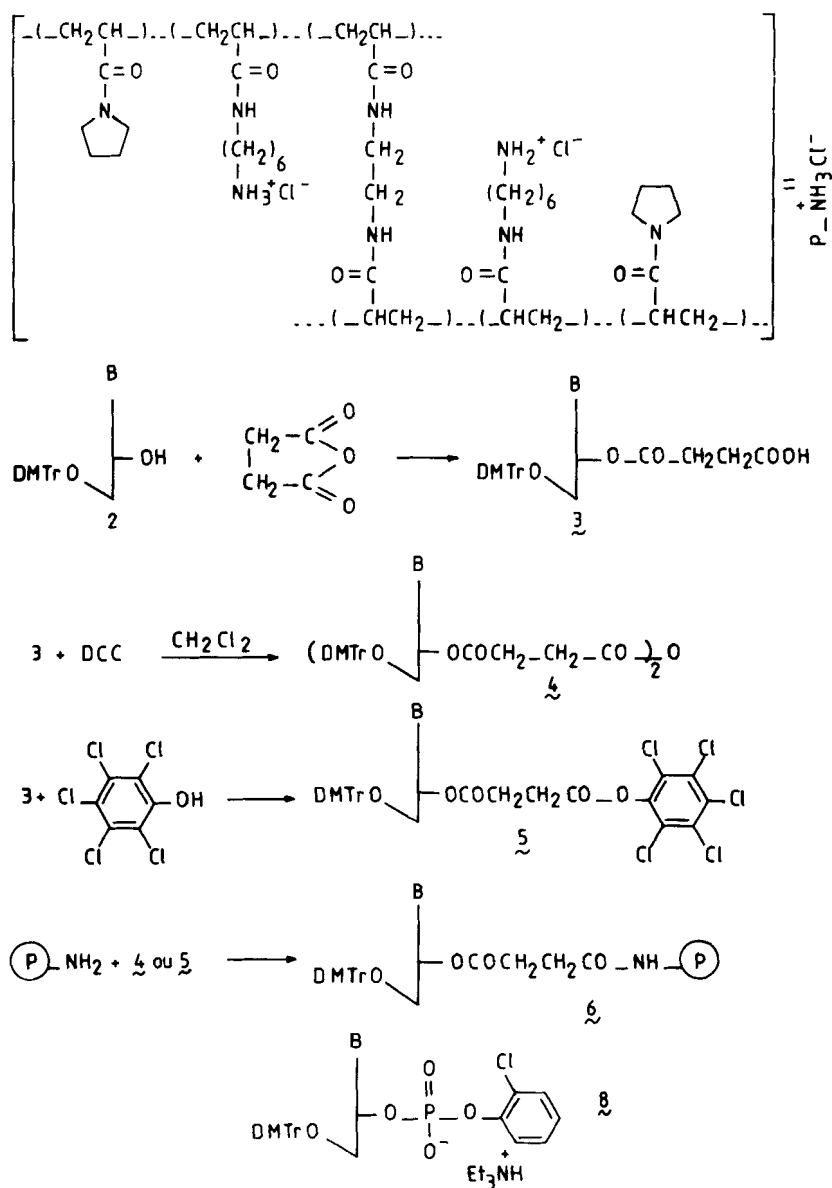


FIG. 1.

avec 84 % de rendement. La résine est traitée par l'ester activé 5 (2,5 équiv.) en présence de triéthylamine (2,75 équiv.) dans le DMF à température ambiante jusqu'au test à la ninhydrine négatif (14).

Après avoir fixé le premier nucléoside sur la résine, celle-ci 6 est traitée pendant 30 mn par une solution de phénylisocyanate à 10 % dans la pyridine pour masquer les groupes NH_2 qui n'auraient pas réagi et pour rendre la résine anhydre (9). Le groupement diméthoxytrityle est alors éliminé par traitement de 6 par une solution à 10 % d'acide trichloroacétique dans le chlorure de méthylène à température ambiante (étape n° 6, Tableau I). La quantité de diméthoxytrityle enlevée a été évaluée par spectrophotométrie à $\lambda = 503 \text{ nm}$ ($\epsilon = 79\,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Nous avons fixé à $0,33 \text{ mmole g}^{-1}$ de nucléoside dans le premier cas et $0,43 \text{ mmole g}^{-1}$ par la deuxième méthode.

Le support 7 (180 mg, 0,059 mmole) 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'élongation (étape n° 4 à n° 12, Tableau I) de la chaîne oligonucléotidique comprend un traitement avec une solution d'acide trichloroacétique à 10 % dans le dichlorométhane pour ôter le groupement diméthoxytrityle puis l'injection du mononucléotide 8 (6 équiv.) (Fig. 1) et de l'agent de condensation, le mésitylène sulfonyl-1 triazole-1,2,4 (MSNT) (12 équiv.) dans 4 ml de pyridine.

Ensuite, un traitement avec une solution d'anhydride acétique dans la pyridine permet de bloquer les groupements hydroxylés en 5' qui n'ont pas réagi (16). Le rendement de chaque étape est estimé par le dosage spectrophotométrique des cations diméthoxytrityles libérés lors du traitement par l'acide trichloroacétique. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau II. Chaque cycle d'élongation (Etape n° 10, Tableau I) dure 180 mn et le nombre d'équivalents de MSNT par millilitres de pyridine est constant et égal à 4, alors que le rapport du nombre d'équivalents de MSNT au nombre d'équivalents de diester 8 est toujours égal à 2.

Au terme du nombre de cycles désirés, une partie aliquote de la résine est détrytilée pour estimer le rendement de la dernière étape de couplage (Tableau II), une autre partie du support est traitée par une solution 0,3 M de nitro-4 *syn*-benzaldoximate de tétraméthyl-guanidinium (17) afin de libérer le nucléotide du support et de le déprotéger partiellement.

TABLEAU I. Cycle de réactions

Etape	Solvant ou réactif	Temps d'agitation	Nombre d'opérations
1	pyridine	2 mn	5
2	10 % ϕ NCO pyridine	30 mn	1
3	pyridine	2 mn	5
4	CH_2Cl_2	2 mn	10
5	CH_2Cl_2	5 mn	3
6	10 % Cl_3CCOOH CH_2Cl_2	2 mn	2
7	CH_2Cl_2	2 mn	5
8	DMF	2 mn	5
9	pyridine	2 mn	10
10	nucléotide + MSNT	180 mn	1
11	pyridine	2 mn	5
12	AC_2O /pyridine	30 mn	1

TABLEAU II.

Longueur de l'oligonucléotide lié	A_{503}	Fonctionnalisation mol/g	Rendement par étape %	Rendement global %
2	0,99	0,45	81	81
3	0,78	0,35	80	64
4	0,75	0,34	97	62
5	0,67	0,30	89	56
6	0,61	0,27	91	50
7	0,55	0,25	92	46

Un traitement par un mélange acide acétique-eau (4/1) conduit à l'oligomère brut complètement déprotégé. Ce résidu est chromatographié sur colonne μ Bondapack C_{18} par chromatographie liquide haute performance (Fig. 2A). La partie correspondante au pic $dT(pT)_6$ est recueillie et chromatographiée pour conduire à l'oligomère $dT(pT)_6$ avec une pureté de 97 % (Fig. 2B). Afin de rechercher les conditions optimales de réaction sur ce nouveau support, nous avons effectué cette suite de réactions en changeant certaines conditions opératoires (Tableau III).

La première étape de condensation a été effectuée sur 150 mg de résine sur laquelle est fixé 0,33 mmole de dT par gramme de support avec 2,8 équiv. de diester 8 et 22,4 équiv. de MSNT dans 4 ml de pyridine pendant 6 heures, et a conduit à un rendement de 98,5 %. De la deuxième à la quatrième étape, le temps de réaction a été réduit à 3 heures et les quantités de diester à 1,6 équiv. Les rendements estimés spectrophotométriquement sont reportés sur le Tableau III.

Lors de l'étape 5, nous avons augmenté la concentration en MSNT et diminué le temps de réaction, ce qui nous a conduit à un rendement de 73 %, alors que la dernière étape effectuée avec 6 équiv. de diester 8 et 12 équiv. de MSNT nous donne un rendement de 98 %. Dans ce deuxième essai, nous avons donc obtenu le $dT(pT)_6$ avec un rendement global de 68 %.

Les premiers résultats des réactions de couplage sur ce nouveau support sont particulièrement encourageants puisque, comparativement aux résultats enregistrés avec d'autres résines polyacrylamides (10,18) ou polyacrylmorpholides (19), les rendements calculés sont supérieurs. D'autre part, nous avons montré qu'il était suffisant d'utiliser 1,5 à 2 équiv. de diester 8 par étape de couplage ce qui est un avantage important par rapport aux autres approches nécessitant l'utilisation d'un large excès de réactif.

PARTIE EXPERIMENTALE

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

La quantité de 0-diméthoxytrityl-5' désoxynucléoside lié de façon covalente à la résine après chaque cycle d'élongation a été déterminée



A

B

FIG. 2 Analyse HPLC de mélanges réactionnels obtenus lors de la préparation de $dT(T)_6$.

A) Profil d'élution HPLC du mélange réactionnel brut.

B) Profil d'élution de l'oligonucléotide $dT(T)_6$ 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 d'une durée de 20 minutes.

TABLEAU III.

Longueur de l'oli- gonucléo- tide lié	Diester équiv.	MSNT équiv.	Temps de réac- tion	MSNT /ml pyr.	Diester /ml pyr.	MSNT dies- ter	Rend ^t par étape %	Rend ^t global %
2	2,8	22,4	6h	5,6	0,7	8	98,5	98
3	1,6	12,8	3h	3,2	0,4	8	100	98
4	1,6	12,8	3h	3,2	0,4	8	98	96
5	2	16,4	3h	4,1	0,5	8	100	96
6	6	74	1h	18,5	1,5	12	73	70
7	6	12	1h30	3	1,5	2	98	68

par mesure du cation diméthoxytrityle libéré après traitement acide. Les effluents provenant des étapes 6 et 7 (Tableau I) sont complétés à 50 ml par du dichlorométhane ; on prélève ensuite 10 ml de cette solution que l'on complète à 100 ml avec une solution d'acide trichloroacétique à 10 % dans le dichlorométhane. On mesure l'absorbance de cette solution à 503 nm et la quantité de cation diméthoxytrityle est déterminée en utilisant un coefficient d'extinction moléculaire de 79.500.

Les analyses et purification par 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 à 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'acétonitrile constitue la phase organique et la phase aqueuse est un tampon d'acétate d'ammonium à 0,1 M (pH = 5,9). Les dérivés désoxynucléoside-N-protégés O-chlorophénylphosphates-3' 8 (sous forme de sel de triéthylammonium) ont été préparés selon la méthode décrite par Reese et coll. (20).

ISOLATION DU dT(pT)₆

Une partie du support contenant le désoxynucléoside sous sa forme entièrement protégée est traitée par une solution 0,3 M de p-nitroben-

zaldoximate de tétraméthylguanidinium dans un mélange dioxanne-eau (1/1, v/v) (1 ml pour 100 mg de résine) à température ambiante pendant 36 heures. Le support est éliminé par filtration et lavé soigneusement (5 fois) avec un mélange dioxanne-eau (1/1). Les filtrats sont rassemblés, neutralisés soigneusement par addition de l'acide acétique, puis lavés au chloroforme (10 x 1 ml) ; la phase aqueuse est ensuite évaporée à sec. Le résidu est repris par un mélange acide acétique/eau (4:1, 1 ml) pendant 30 mn. Après évaporation à sec, le résidu est coévaporé 10 fois à l'eau, puis redissous dans un mélange eau/éthanol (1:1). Le dT(pT)₆ est isolé par HPLC sur colonne de Partisil B C₁₈ (Fig. 2).

L'élution a lieu avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 12 % en 20 mn, à un débit de 10 ml mn⁻¹. La fraction appropriée est dessalée sur une colonne de Sephadex G25. L'analyse HPLC du composé obtenu (Fig. 2) indique une pureté optique de 97 %.

La caractérisation du dT(T)₆ obtenu dans chacun des cas a été effectuée par HPLC en comparant les temps de rétention du produit obtenu avec ceux d'échantillons témoins. D'autre part, l'analyse des produits résultant de la digestion enzymatique par la phosphodiesterase de venin de Crotale a été effectuée après 36 heures à 37°C par HPLC sur colonne C₁₈ en phase inverse en utilisant un gradient de 2 à 12 % en acétonitrile. Dans le chromatogramme obtenu, le rapport dT/pT proche de 1/6 est en accord avec la structure proposée.

REFERENCES

1. Z.A. Shaborava, Nucleic Acid Res. Symposium Series, **7**, 259 (1980).
2. M. Caruthers et M.D. Matteuci, Tetrahedron Letters, **21**, 719 (1980).
3. K.K. Ogilvie et M.J. Nemer, Tetrahedron Letters, 4159 (1980).
4. J. Ben Hattar, B. Rayner et J.L. Imbach, Nucleosides et Nucleotides, **1**, 289 (1982).
5. T.P. Horn, M.P. Vasser, M.E. Struble et R. Crea, Nucleic Acid Res. Symposium Series, **7**, 225 (1980).
6. E. Atherton, M.J. Gait, R.C. Sheppard et B.J. Williams, Bioorg. Chem., **8**, 351 (1979).
7. C.K. Narang, K. Brunfeld et K.E. Norris, Tetrahedron Letters, 1819 (1977).
8. K.E. Norris, F. Norris et K. Brunfeld, Nucleic Acid Res. Symposium Series, **7**, 233 (1980).

9. P. Dembeck, K. Miyoshi et K. Itakura, J. Am. Chem. Soc., **103**, 706 (1981).
10. M.J. Gait, M. Singh, R.C. Sheppard, M.D. Edge, A.R. Greene, G.R. Heathcliffe, T.C. Atkinson, C.R. Newton et A.F. Markham, Nucleic Acid Res., **8**, 1081 (1980).
11. M.J. Gait, H.W.D. Matthes, M. Singh et R.C. Titmas, J. Chem. Soc. Chem. Comm., 37 (1982).
12. G.L. Stahl, R. Walter et C.W. Smith, J. Am. Chem. Soc., **101**, 5383 (1979).
13. M. Miyoshi et K. Itakura, Tetrahedron Letters, 3635 (1979).
14. E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger et P.I. Cook, Anal. Biochem., **34**, 595 (1970).
15. J. Igolen et C. Morin, J. Org. Chem., **45**, 4802 (1980).
16. F. Chow, T. Kempe et G. Palm, Nucleic Acid Res., **9**, 2807 (1981).
17. C.B. Reese, R.C. Titmas et L. Yau, Tetrahedron Letters, 2727 (1978).
18. M.D. Edge, A.R. Greene, G.R. Heatcliffe, P.A. Meacock, W. Schuch, D.B. Scanlon, T.C. Atkinson, C.R. Newton et A.F. Markham, Nature, **292**, 756 (1981).
19. E. Ohtsuka, H. Takashima et M. Ikehara, Tetrahedron Letters, 765 (1981).
20. J.B. Chattopadhyaya et C.B. Reese, Tetrahedron Letters, 5059 (1979).

Received February 21, 1983