

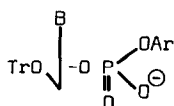
ALKYL ARYL BROMOPHOSPHATES : NOUVEAUX REACTIFS DE PHOSPHORYLATION

N.T. Thuong et M. Chassignol

Centre de Biophysique Moléculaire, C.N.R.S.,
 1A, avenue de la Recherche Scientifique, 45045 Orléans France

Résumé. La réaction des bromophosphates (5) avec le 5'-O-monométhoxytritylthymidine dans la pyridine conduit facilement soit au nucléoside-3'-phosphotriester (7), soit au nucléoside 3'-phosphodiester (8) selon l'ordre d'addition des réactifs.

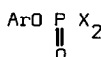
La méthode au "phosphotriester" la plus utilisée à l'heure actuelle pour préparer les oligo déoxynucléotides, consiste à coupler un nucléoside-3'-phosphodiester (1) avec l'hydroxyle-5' d'un nucléoside convenablement protégé^(1,2) [2a ; R = R'CO) (2b ; R = P(O)(OAr) (OCH₂CH₂CN)].



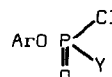
1



2



3

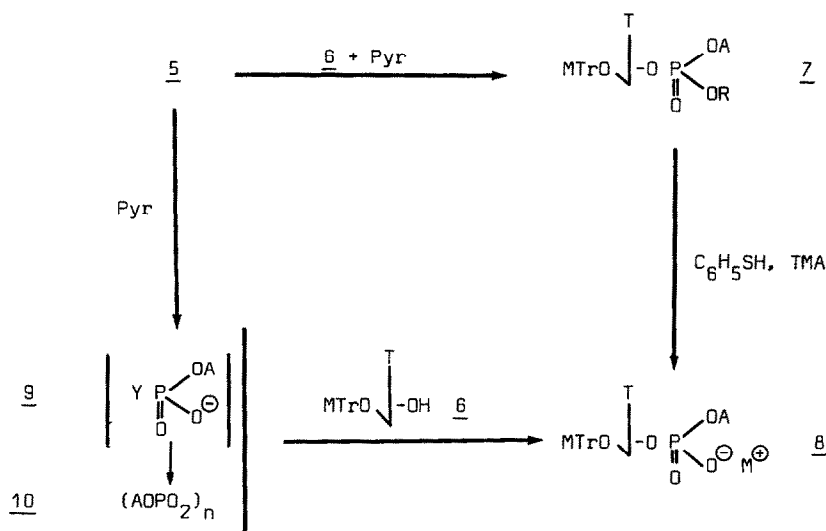
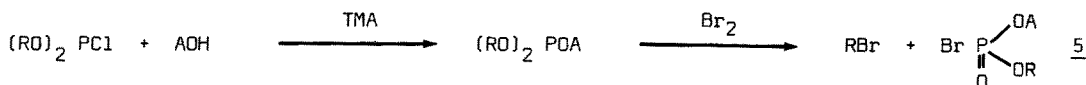


4

La synthèse des intermédiaires clefs (1 et 2b) se fait, en général, par des réactifs de phosphorylation bifonctionnels (3)⁽²⁾ qui souvent conduisent aux triesters symétriques⁽³⁾. Afin de remédier à cet inconvénient, les chlorophosphates monofonctionnels (4 ; Y = C₆H₅NH, Cl₃CCH₂O, p-NO₂-C₆H₄O, NCCCH₂CH₂O)⁽⁴⁾ ont été récemment utilisés.

Dans cette note, nous décrivons une nouvelle classe de réactifs de phosphorylation monofonctionnels (5). Les alkyl aryl bromophosphates (5) ont été préparés facilement par action du brome sur les phosphites^(5a) [¹H RMN ; CCl₄, Me₄Si = O, δ : ppm, J : Hz [5a ; CH₃ (3H, d, δ = 4,07, J = 15,3)] [5b ; CH₃ (3H, d, δ = 4, J = 14,7)] [5c ; CH₃ (3H, t, δ = 1,45), CH₂ (2H, m, δ = 4,4)]].

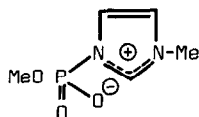
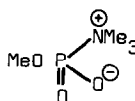
La réactivité des bromophosphates est très grande. Par exemple, la formation des triesters (7) est pratiquement terminée après 15 à 30 minutes à la température ambiante, lorsqu'on ajoute une solution benzénique (0,6 ml) de bromophosphates (5a, 5b, 5c et 5d ; 2,5 mmole) à une solution de 5'-O-monométhoxytritylthymidine⁽⁶⁾ (6 ; 1 mmole) dans la pyridine (7 ml) à - 20°C. La chromatographie sur couche mince (CCM)⁽⁷⁾ du mélange réactionnel montre qu'il se forme, à côté des triesters (7a, 7b et 7d ; R = Me) respectivement environ 3-4 % de diesters (8a, 8b) et 5-7 % de diesters (8d) ; par contre, on n'observe pas de formation de diester (8b) dans le triester (7c ; R = Et). Après avoir détruit l'excès de bromophosphate (eau-pyridine), les triesters ont été isolés sous forme de solide blanc, par extraction avec du chloroforme suivie d'une chromatographie sur une courte colonne de gel de silice. Les rendements sont de l'ordre de 85 % [CCM, système A (7a ; Rf = 0,86), (7b ; Rf = 0,85), (7c ; Rf = 0,87), (7c détritylé ; Rf = 0,73), (7d ; Rf = 0,81)].



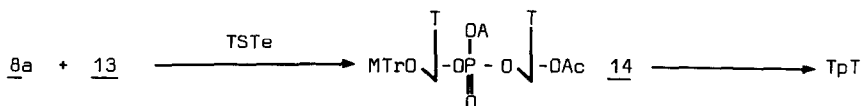
Pour [5 et 7, (a ; R = Me, A = o.Cl-C₆H₄), (b ; R = Me, A = p.Cl-C₆H₄), (c ; R = Et, A = p.Cl-C₆H₄), (d ; R = A = Me)] ; pour [8, (a ; A = o.Cl-C₆H₄), (b ; A = p.Cl-C₆H₄), (d ; A = Me), (M⁺ = Me₃N⁺H ou H Pyr⁺)] ; Y = Br ou Pyr⁺, Pyr = pyridine, TMA = Me₃N.

Il a été montré que les esters méthyliques neutres des acides dérivés du phosphore tétra-coordiné peuvent être sélectivement déméthylés^(5b,5c). De même, les triesters (7 ; 1 mmole) réagissent facilement à la température ambiante (quelques heures pour 7a, 7b et 7d, 1 jour pour 7c) avec le couple C₆H₅SH, TMA (~ 4 mmole) dans l'acétonitrile (5 ml) pour conduire aux sels de triméthylammonium des diesters (8) pratiquement purs ; nous n'avons détecté ni détritulation, ni rupture de la liaison P-O-Ar conduisant au méthyl-diester (8d) non souhaité. Après avoir éliminé les produits volatils sous vide, les sels de triméthylammonium des diesters (8 ; M⁺ = ⁺NHMe₃) ont été isolés sous forme de solide blanc, par dissolution du résidu dans un minimum de THF puis par reprécipitation par l'éther [CCM, système B, (8a ; Rf = 0,63), (8a détritilé ; Rf = 0,52), (8b par déméthylation ; F : 118-120°C déc., Rf = 0,65), (8b détritilé ; Rf = 0,52), (8b par dééthylation ; F : 118-120°C déc., Rf = 0,65), (8d ; Rf = 0,60), (8d détritilé ; Rf = 0,45)].

Nous avons d'autre part observé que lorsqu'on remplace le diméthylbromophosphate (5d) par le diméthylchlorophosphate, la proportion du triester (7d) formé n'est que de 3-5 % après 15 min. à 20°C ; par contre, après une nuit, le mélange réactionnel renferme ~ 65 % de diester (8d), 5-7 % de triester (7d) et 4 autres composés ayant le groupe méthoxytrityle. Ce fait serait dû, d'une part à la faible réactivité de la liaison P-Cl par rapport à celle de P-Br et d'autre part à l'évolution rapide du diméthylchlorophosphate vers des structures ioniques, telles que 9 ; A = Me, Y = Cl ou Pyr⁺) sous l'action de la pyridine. En effet, le diméthylchlorophosphate réagit facilement avec le 1-méthyl-imidazole et la TMA pour donner respectivement le méthylphosphoimidazolium (11)^(5d) et le méthylphosphotriméthylammonium (12)^(5e).

1112

En vue d'obtenir les diesters (8) en une seule étape, les bromophosphates (5a et 5b ; 3 mmole dans 0,6 ml de benzène) ont été d'abord traités avec la pyridine (3 ml, addition à - 20°C) pendant 30 min., à la température ambiante, puis avec une solution de 6 ; 1 mmole) dans la pyridine (1 ml). Après quelques heures à 20°C, la CCM montre que la formation des diesters (8a et 8b) est pratiquement quantitative. Après avoir détruit l'excès de réactif de phosphorylation (eau-pyridine), les sels de pyridinium des diesters (8a et 8b) ont été isolés par simple extraction avec du chloroforme. Les rendements de produits isolés sont de l'ordre de 85-90 % [8a ; M⁺ = H Pyr⁺, F : 122-125°C ; ³¹P RMN ; CDCl₃. (MeO)₃PO interne = 0, pic unique δ = 8,98 ppm, CCM ; système B, R_f = 0,63], (8b ; M⁺ = H Pyr⁺, F : 108-110°C, CCM ; système B, R_f = 0,64)].



Le couplage de (8a ; 2 mmole) avec la 3'-acétylthymidine (13 ; 1 mmole)⁽⁸⁾ en présence de 2,4,6-triisopropylbenzènesulfonyltétrazole (TSTe ; 3 mmole)^(2f) donne le TpT totalement protégé (14) sous forme de solide blanc et avec un rendement de 80 % après purification⁽⁹⁾ (CCM ; système A', R_f = 0,68). L'élimination des groupements protecteurs de (14)⁽¹⁰⁾ suivie d'une purification sur une colonne de DEAE cellulose (gradient linéaire : 10⁻³M-10⁻¹M, HNH₄CO₃) conduit au TpT qui a été identifié avec un authentique échantillon de TpT ; le rendement est de 83 % (CCM ; système B, R_f = 0,31).

REFERENCES ET NOTES

1. a) N. Katagiri, K. Itakura and S.A. Narang, J.C.S. Chem. Comm., 325 (1974).
 b) T. Hirose, R. Crea and K. Itakura, Tetrahedron Letters, 2449 (1978).
 c) R. Crea, T. Hirose and K. Itakura, Tetrahedron Letters, 395 (1979).
2. a) J.C. Caplin and F. Cramer, J. Org. Chem., 38, 245 (1973).
 b) K. Itakura, C.P. Bahl, N. Katagiri, J.J. Michniewicz, R.H. Wightman and S.A. Narang, Can. J. Chem., 51, 3649 (1973).
 c) K. Itakura, N. Katagiri, C.P. Bahl, R.H. Wightman and S.A. Narang, J. Amer. Chem. Soc., 97, 7327 (1975).
 d) N. Katagiri, K. Itakura and S.A. Narang, J. Amer. Chem. Soc., 97, 7332 (1975).
 e) H. Takaku, M. Kato and T. Hata, J.C.S. Chem. Comm., 190 (1977).
 f) J. Stawinski, T. Hozumi, S.A. Narang, C.P. Bahl and W. Wu, Nucleic Acids Res., 4, 353 (1977).
3. a) R. Arentzen and C.B. Reese, J.C.S. Perkin I, 445 (1977).
 b) R.W. Adamiak, M.Z. Barciszewska, E. Biala, K. Grzeskowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, W.T. Markiewicz and M. Wiewiorowski, Nucleic Acids Res., 3, 3397 (1976).
4. a) W.S. Zielinski, Z. Lesnikowski, Synthesis, 185 (1976).
 b) J.H. Van Boom, P.M.J. Burgers and P.H. Van Deursen, Tetrahedron Letters, 869 (1976).
 c) C.B. Reese and Y.T. Yan Kui, J.C.S. Chem. Comm., 802 (1977).
 d) R. Crea, A. Kraszewski, T. Hirose and K. Itakura, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 5765 (1978).
5. a) N.T. Thuong, C. Tran, U. Asseline et P. Chabrier, C.R. Acad. Sci., 290(C), 53 (1980).
 b) N.T. Thuong, C. Clergue, E. Larruat et P. Chabrier, Bull. Soc. Chim. Fr., 1407 (1964).
 c) N.T. Thuong, Bull. Soc. Chim. Fr., 928 (1971).
 d) P.E. Chabrier, H.P. Nguyen, N.T. Thuong et P. Chabrier, C.R. Acad. Sci., 288(C), 379 (1979).
 e) L. Héau, P.E. Chabrier, N.T. Thuong et P. Chabrier, C.R. Acad. Sci., 288(C), 529 (1979).
6. H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch et H.G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc., 85, 3821 (1963).
7. CCM : Merck DC Alufolien Kieselgel, 60F254, solvant : CH_2Cl_2 , MeOH (9:1, v/v, système A), (85:15, v/v, système A') ; iso-PrOH, Et_3N , H_2O (85:5:10, v/v, système B).
8. J.P. Horwitz, J.A. Urbanski et J. Chua, J. Org. Chem., 27, 3300 (1962).
9. Plaque préparative, Merck, Kieselgel 60F254, solvant CH_2Cl_2 -MeOH (85:15, v/v).
10. Réaction avec NaOH 0,1 N (eau-dioxane) 2 h à 20°C puis avec $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ à 80 % pendant 14 h à 20°C.

(Received in France 15 March 1980)