

PREPARATION RAPIDE DES MONONUCLEOSIDES-3' MONOPHOSPHATE PROTEGES
UTILISABLES EN SYNTHÈSE OLIGONUCLEOTIDIQUE

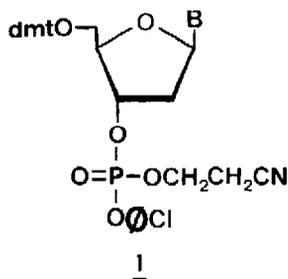
D. MOLKO, R.B. DERBYSHIRE, A. GUY, A. ROGET, R. TEOULE

Département de Recherche Fondamentale, Laboratoire de Radiobiologie, Centre
d'Etudes Nucléaires de Grenoble, 85 X, 38041 GRENOBLE Cedex, France

Abstract : Fully protected mononucleotides are prepared by the action of parachlorophenylphosphodichloridite in THF on the corresponding nucleosides followed by oxidation with iodine.

Depuis les travaux de MICHELSON et TODD (1), la synthèse des oligonucléotides par la méthode des phosphotriesters a connu un développement considérable parce qu'elle conduit à des intermédiaires stables et non ioniques que l'on peut séparer par les méthodes conventionnelles de la chimie organique.

Cette voie de synthèse fait appel à des synthons tels le composé 1 (figure 1) dont la fonction alcool primaire en position 5' est protégée par un groupement diméthoxy-4,4' trityle et la position 3' porteuse d'un groupement phosphate triester.



B : Thymine ou benzoyl-N₆ adénine ou isobutyryl-N₂
guanine ou anisoyl-N₂ cytosine

dmt : Diméthoxy-4,4' trityle

φCl : Parachlorophényle

Figure 1

La préparation de ces composés a été décrite par NARANG *et al.* (2) ; elle consiste à phosphoryler par action du parachlorophénylphosphodichloridate un désoxy-2' nucléoside protégé en 5' puis à l'estérifier par le cyanoéthanol.

Pour les nucléosides protégés de la thymine, de la cytosine et de l'adénine, nous avons obtenu des résultats corrects. Par contre, avec la désoxy-2' guanosine, les rendements obtenus n'ont pas été satisfaisants. Lors de cette condensation, il semble que l'étape limitante est la fixation du groupement cyanoéthyle sur le phosphate diester.

Récemment, d'autres auteurs (3) ont développé une variante de cette méthode en isolant le diester intermédiaire sous forme de sel de baryum, puis en réalisant la cyanoéthylation à l'aide d'un agent de condensation de type arylsulfonylnitroimidazole. Cette modification augmente le temps de réaction et met en oeuvre des quantités importantes de solvant, ce qui est peu compatible avec l'extension de cette synthèse à une grande échelle au laboratoire.

Nous avons donc testé un agent de phosphorylation plus réactif, qui fixerait facilement le groupement cyanoéthyle : le parachlorophénylphosphodichloridite.

Ce dérivé trivalent du phosphore a déjà été utilisé en synthèse oligonucléotidique par LETSINGER *et al.* (4) pour la synthèse de dimères et trimères de la thymidine.

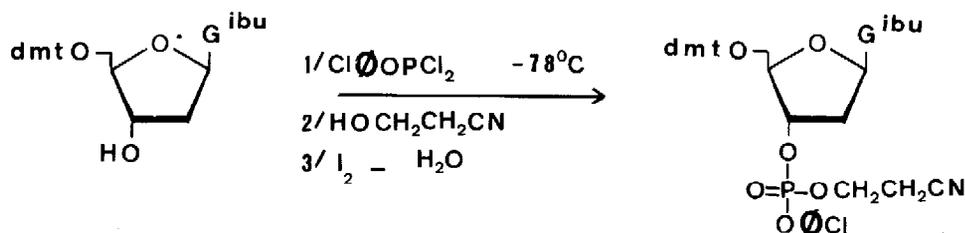


Figure 2

Le parachlorophénylphosphodichloridite est préparé selon la méthode de TOLKMITH (5) et condensé sur la (diméthoxy-4,4' trityl-5' isobutyryl- N_2 désoxy-2' guanosine (5 g - 7,8 mmoles) dans le THF anhydre à -78°C pendant 3,5 mn en présence de lutidine-2,6 (figure 2).

L'addition de cyanoéthanol est effectuée puis cette basse température est maintenue pendant 20 mn. La réfrigération est stoppée ; quand la température atteint -20°C , 6 équivalents de lutidine sont ajoutés et l'oxydation du phosphite intermédiaire est effectuée par 3 g d'iode en solution dans 25 ml de mélange THF/ H_2O (2:1 v/v). Lorsque le mélange est à température ambiante, l'excès d'iode est détruit par une solution concentrée de bisulfite de sodium. Le THF est ensuite chassé sous pression réduite et le produit désiré est extrait au chloroforme. Après lavage à l'eau, le résidu est fractionné sur colonne de gel de silice pour conduire à 4,90 g de triester (Rdt : 71 %).

Pour éviter la formation lors de la première étape de dinucléoside de liaison 5' \rightarrow 5', il a été employé 1,5 équivalents d'agent phosphorylant. Pour assurer une bonne fixation du groupement cyanoéthyle sur le phosphate, le cyanoéthanol est ensuite ajouté à raison de 3 équivalents.

La même réaction, effectuée sur les dérivés correspondants de la thymidine, de la désoxy-2' cytidine et de la désoxy-2' adénosine a permis d'obtenir les mononucléosides-3' monophosphate complètement protégés avec des rendements respectifs de 77 %, 80 % et 79 %.

En conclusion, la méthode que nous proposons ici permet de préparer rapidement et en quantités importantes, les monomères utilisables en synthèse oligonucléotidique.

Remerciements : Ce travail a été réalisé grâce à l'apport financier de l'INSERM, contrat n° 17 ATP 52 77 84.

Bibliographie :

1. A.M. MICHELSON et A.R. TODD, J. Chem. Soc. 2632 (1955).
2. N. KATAGIRI, K. ITAKURA et S.A. NARANG, J. Amer. Chem. Soc. 97, 7332 (1975).
3. G.R. GOUGH, C.K. SINGLETON, H.L. WEITH et P.T. GILHAM, Nucleic Acids Res. 6, 1557 (1979).
4. R.L. LETSINGER et W.B. LUNSFORD, J. Amer. Chem. Soc. 98, 3655 (1976).
5. H. TOLKMITH, J. Org. Chem. 23, 1682 (1958).

(Received in France 13 February 1980)