

NOUVELLE SYNTHÈSE SIMPLE DE NUCLEOSIDE PHOSPHOROTHIOLATE

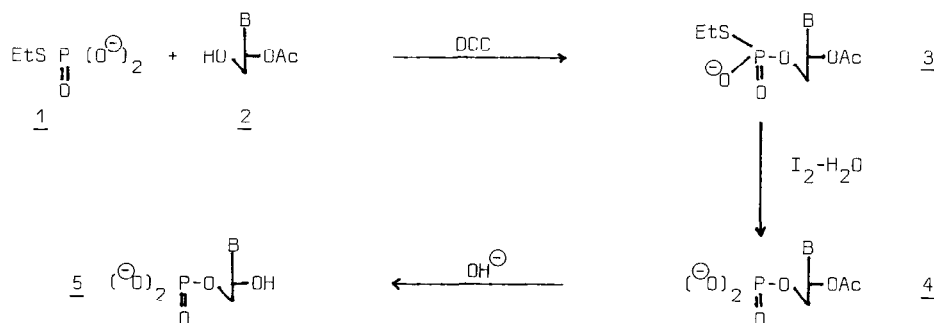
U. Asseline et N.T. Thuong

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

Summary. The O,S-dimethylphosphorochloridate 10 reacts with 5'-O-monomethoxytritylthymidine 11 in pyridine giving nucleoside-3'-thiophosphodiester 13 in high yields; in acetonitrile and in the presence of 1-methylimidazole, this reaction leads to the nucleoside-3'-phosphotriester 14 without formation of diester 13. From the latter, the Tp and TpT have been prepared.

Le nucléoside-5'-phosphorothiolate 3 dont le groupe thioéthyle peut être facilement éliminé par action d'iode en milieu aqueux a été introduit en synthèse nucléotidique par Cook, Nussbaum et coll. (1-5). Ces auteurs obtiennent cet intermédiaire en même temps que des produits secondaires par condensation du S-éthylthiophosphate 1 avec le 3'-acétylnucléoside 2 (Schéma 1).

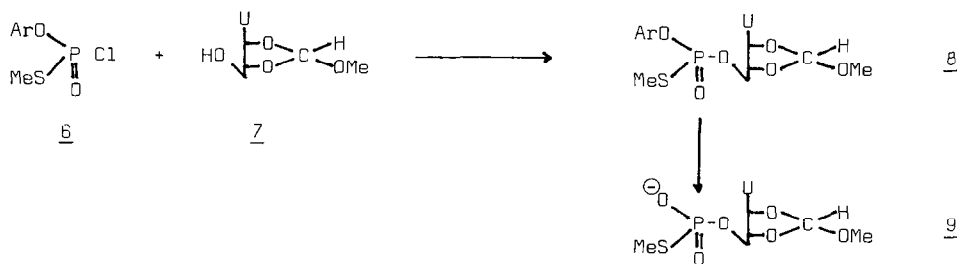
Schéma 1



B = thymine, benzoyl-N₆-adénine ; DCC = dicyclohexylcarbodiimide

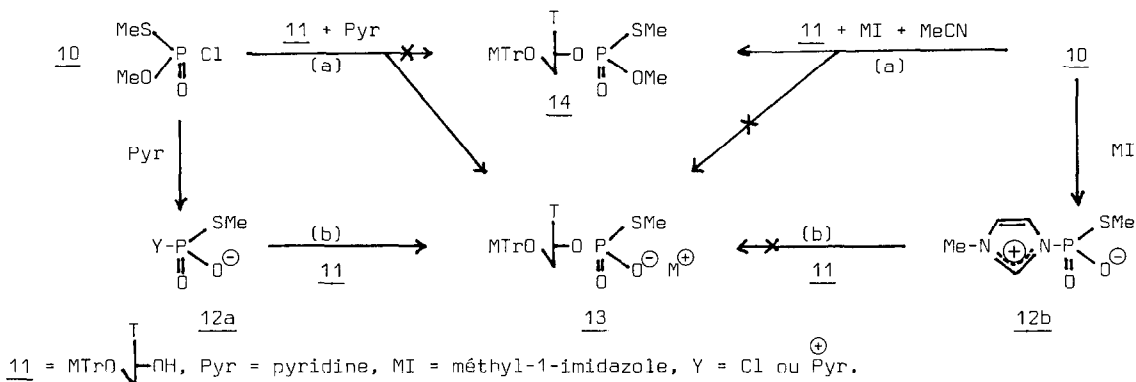
Plus récemment, Reese et coll. (6) ont synthétisé le diester S-méthyle 9 par déarylation du triester 8 au moyen du syn-4-nitrobenzaloxine (Schéma 2).

Schéma 2

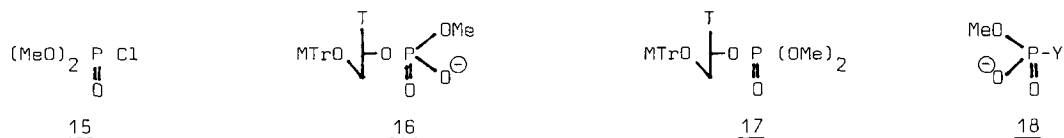


Dans cette note, nous décrivons une synthèse simple du nucléoside-3'-phosphorothiolate 13 (Schéma 3). Ce composé a été obtenu en une seule étape lorsqu'on fait réagir le 0,S-diméthylchlorophosphate 10 (3 mmol)⁽⁷⁾ avec le 5'-O-monométhoxytritylthymidine 11 (1 mmol)⁽⁸⁾ dans la pyridine (7 ml). La chromatographie sur couche mince (CCM)⁽⁹⁾ du mélange réactionnel montre que la réaction est terminée après 3 h à la température ambiante et que contrairement aux bromophosphates⁽¹⁰⁾, la formation du diester 13 est pratiquement exclusive quel que soit l'ordre d'addition des réactifs⁽¹¹⁾; le sel de pyridinium 13 a été isolé sous forme de solide blanc [CCM, Rf ≈ 0 (système A), Rf ≈ 0,52 (système B)] après hydrolyse ménagée de l'excès de 10 suivie d'une extraction par le chloroforme et cristallisation dans l'éther. Les rendements de ces deux préparations (voies a et b) sont équivalents et de l'ordre de 92-95 %.

Schéma 3



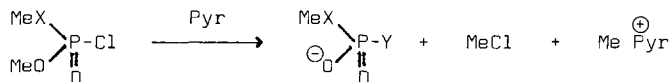
L'obtention pratiquement quantitative du diester 13 par les deux voies de synthèse suggère que, dans la pyridine, la formation de l'intermédiaire ionique 12a (réaction de déméthylation) est beaucoup plus rapide que la réaction de phosphorylation de la fonction alcool secondaire du nucléoside 11 par 10. La formation du diester 16 a été déjà observée⁽¹⁰⁾ lorsqu'on ajoute le diméthylchlorophosphate 15 à une solution de nucléoside 11 dans la pyridine; cependant, cette réaction conduit à un mélange complexe de diester 16 (~ 65 %) de triester 17 (5-7 %) et de 4 autres composés possédant le groupe méthoxytrityle.



Cette différence de comportement en synthèse entre ces deux chlorures d'acide 10 et 15 est aussi observée lorsqu'on étudie les spectres RMN-¹H⁽¹²⁾ du mélange [chlorure d'acide, pyridine, CDCl₃]. Les résultats du tableau montrent que :

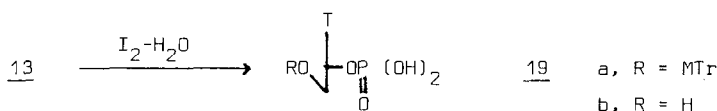
- La réaction de déméthylation est beaucoup plus rapide pour le thiolate 10 (12a ~ 100 % après 15 mn et disparition du MeO-P) que pour son isostère 15 (~ 50 % après 30 mn).
- Contrairement à 10 qui dans la pyridine donne un seul doublet correspondant au groupe MeSP de 12a le composé 15 dans les mêmes conditions donne au moins 4 doublets correspondant aux groupes MeOP (δ ~ 3,9 ppm), de plus, ce dernier, après une nuit, conduit à un mélange dont le groupe méthyle du CH₃OP (~ 43 %) est en défaut par rapport à ceux du chlorure de méthyle (~ 10 %)

et du méthylpyridinium ($\sim 47\%$) formés ; ces résultats montrent que la réaction entre 15 et la pyridine est complexe et qu'elle va plus loin que la formation du composé ionique 18 par mono-déméthylation.



Temps (mn)	X	%	%	%	%
1	S	~ 65	~ 35	~ 10	~ 18
5		20	80	35	50
15		ϵ	100	44	56
1	O	95		< 2	3
30		50		15	35

Lorsqu'on réalise la réaction de phosphorylation selon la voie (a) et en remplaçant la pyridine par une solution de méthyl-1-imidazole (6 mmol) dans l'acétonitrile (6 ml), on obtient principalement le triester 14 ($\sim 90\%$, CCM, système A, $R_f \sim 0,71$) et trois autres composés ($\sim 10\%$) possédant le groupe méthoxytrityle dont le nucléoside 11 ; par contre, on n'observe pratiquement pas de formation de diester 13. Ces résultats sont dûs d'une part à la faible concentration en amine utilisée, atténuant ainsi la formation du phosphoimidazolium 12b et d'autre part à la faible réactivité de ce dernier par suite de la délocalisation de la charge entre les deux atomes d'azote de l'imidazolium. Nous avons en effet préparé l'intermédiaire 12b⁽¹³⁾ et observé que ce composé (0,3 mmol) ne réagit pratiquement pas avec le nucléoside 11 (0,1 mmol) dans l'acétonitrile après 3 jours à la température ambiante.



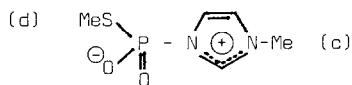
La réaction du nucléoside-3'-phosphorothiolate 13 (0,1 mmol) avec l'iode (120 mg) en milieu eau-acétone, conduit, après 2 h à la température ambiante, non pas à la 5'-méthoxytritylthymidine-3'-phosphate 19a, mais directement à la thymidine-3'-phosphate 19b par suite de l'acidité formée. Ce composé isolé sous forme de sel de sodium⁽¹⁴⁾ avec un rendement de 83 % donne une tache unique en CCM [$R_f \sim 0$ (système B), $R_f \sim 0,55$ (système C)], il a été identifié avec un échantillon de thymidine-3'-phosphate préparé par une autre méthode.

Références et notes

1. A.L. Nussbaum et R. Tiberi, J. Am. Chem. Soc., 87, 2513 (1965).
2. A.F. Cook, J. Am. Chem. Soc., 92, 190 (1970).

3. A.F. Cook, M.J. Holman et A.L. Nussbaum, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1522 (1969).
4. M.S. Poonian, E.F. Nowoswiat et A.L. Nussbaum, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 3992 (1972).
5. A.F. Cook, E.P. Heimer, M.J. Holman, D.T. Maichuk et A.L. Nussbaum, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1334 (1972).
6. B. Reese et L. Yau, *J.C.S. Chem. Comm.*, 1050 (1978).
7. Préparation par chloruration de O,S-diméthylphosphate de tétraméthylammonium (0,1 mol) par PCl_5 (0,1 mol) dans CCl_4 , $E_b^\circ\text{C}/\text{mmHg} = 70/15$, $n_D^{20} = 1,497$, $[\text{RMN-}^1\text{H}, \text{CDCl}_3, \text{TMS} = 0, \text{MeO} (d, \delta = 4 \text{ ppm}, J = 15,3 \text{ Hz}), \text{MeS} (d, \delta = 2,51 \text{ ppm}, J = 18,6 \text{ Hz})]$, Rdt = 65 %.
8. H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch et H.G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3621 (1963).
9. CCM : Merck DC Alufolien Kieselgel, 60F254, solvant : CH_2Cl_2 , MeOH (9:1, v/v, système A ; **11**, Rf $\sim 0,52$) ; iso-PrOH, Et_3N , H_2O (85:5:10, v/v, système B), iso-PrOH, NH_4OH , H_2O (70:20:10, v/v, système C) ; Cellulose F254, solvant : EtOH, NH_4Ac M dans H_2O (70:30, v/v, système D).
10. N.T. Thuong et M. Chassignol, *Tetrahedron Letters*, 2063 (1980).
11. Addition à -20°C d'une solution benzénique de **10** à une solution de **11** dans la pyridine (voie a) ou addition de **11** à un mélange de **10** et de pyridine (voie b).
12. RMN- ^1H ; chlorure d'acide (**10**, **15**) (3 mmol), Pyr (0,25 ml), CDCl_3 (0,15 ml), $\text{Me}_4\text{Si} = 0$, température ambiante, δ : ppm, J : Hz. [**10** ; MeS (d, $\delta = 2,42$, J = 18,66), MeO (d, $\delta = 3,85$, J = 14,6)], [**12a** ; MeS (d, $\delta = 2,22$, J = 17)], [**15** ; MeO (d, $\delta = 3,9$, J = 13,7)], MeCl (s, $\delta = 2,9$), MePyr (s, $\delta = 4,77$).
13. On ajoute à 0°C sous agitation et sous légère dépression une solution benzénique (4 ml) de chlorure d'acide **10** (10^{-2} mol) à une solution de méthyl-1-imidazole (10^{-2} mol) dans le benzène (6 ml). Après 24 h à la température ambiante on isole le phosphoimidazolium **12b** par essorage. F : 130°C , Rdt : 80 %.

(a)



(b)

RMN- ^1H , D_2O , TPS ; a (m, $\delta = 7,8$), b (m, $\delta = 9,1$), c (s, $\delta = 4$), d (d, $\delta = 2,2$, J = 16)

14. Après extraction de l'excès d'iode et du tritanol par l'éther, la phase aqueuse est neutralisée avec NaHCO_3 puis évaporée sous vide ; la thymidine-3'-phosphate de sodium est ensuite lavée avec l'acétone jusqu'à disparition d'iodure de sodium.

(Received in France 17 November 1980)