

NOUVELLE SYNTHÈSE SIMPLE DE DEOXYRIBONUCLEOSIDE-3'-ARYL-β-CYANOETHYL-PHOSPHATES

N.T. Thuong, M. Chassignol et C. Barbier

Centre de Biophysique Moléculaire, C.N.R.S.,

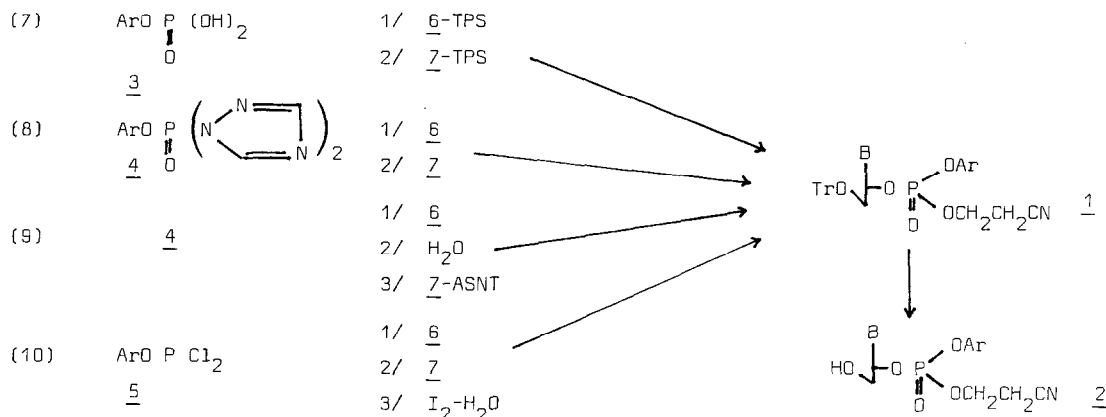
1A, avenue de la Recherche Scientifique, 45045 Orléans Cédex, France

Summary. The deoxyribonucleoside-3'-aryl-β-cyanoethyl-phosphates, very used in the synthesis of oligodeoxynucleotides, were synthesized in high yields in a single step from the nucleoside derivatives with a monofunctional phosphorylating agent : cyclohexylammonium p-chlorophenyl-β-cyanoethyl-phosphate.

La méthode au phosphotriester innovée par Michelson et Todd⁽¹⁾, modifiée par Cramer et coll.⁽²⁾, puis par Narang et coll.⁽³⁾, connaît actuellement un développement extrêmement important en synthèse d'oligo- et de polydéoxynucléotides. Cette méthode fait appel à des nucléoside-3'-phosphotriesters et parmi lesquels, les déoxynucléoside-3'-aryl-β-cyanoéthyl-phosphates 1 occupent une place prédominante^(4,5,6).

La synthèse des précurseurs tritylés 1 de cette classe de composés a été décrite par Narang et coll.^(7,8), puis récemment par Gough et coll.⁽⁹⁾ et Téoule et coll.⁽¹⁰⁾. Ces préparations utilisent des réactifs de phosphorylation bifonctionnels 3, 4 et 5 et nécessitent plusieurs étapes (schéma 1).

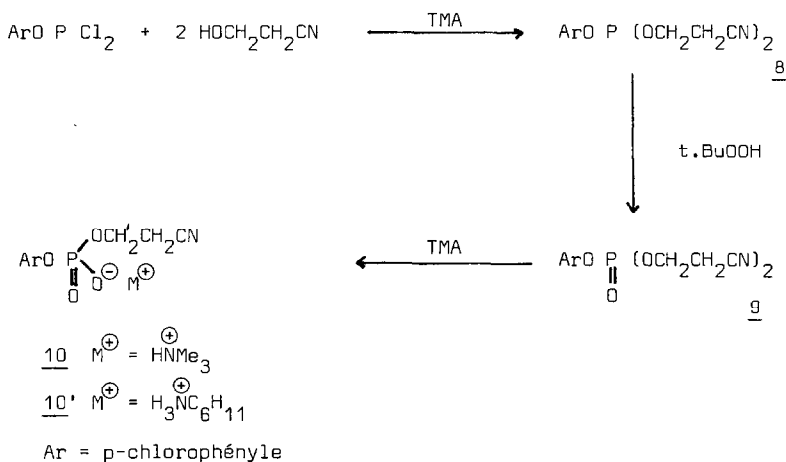
Schéma 1



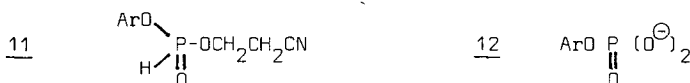
6 = TrO-CH₂-OH ; 7 : β-cyanoéthanol ; TPS : triisopropylbenzènesulfonylchlorure ; ASNT : aryl-sulfonyl-4-nitroimidazole. B : thymine, N-benzoyl-adénine, N-anisoyl-cytosine, N-isobutyryl-guanine.

Nous décrivons une nouvelle synthèse de déoxynucléoside-3'-phosphotriester 1 en une seule étape par l'intermédiaire d'un réactif monofonctionnel 10 dont la préparation a été réalisée selon le schéma 2.

Schéma 2



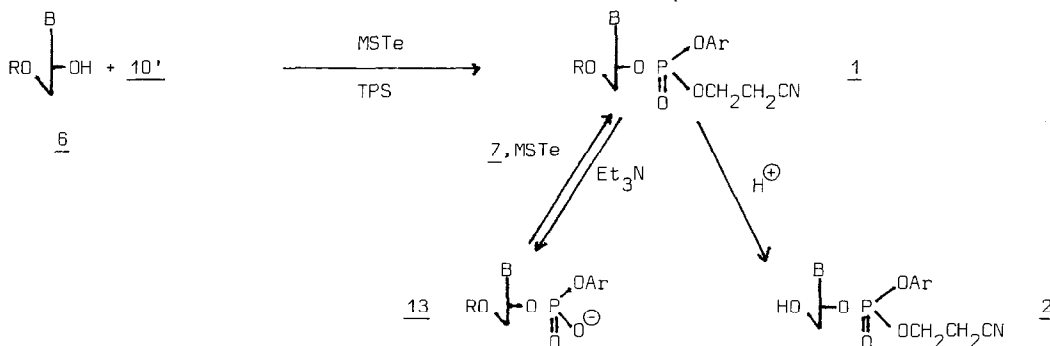
La condensation du p-chlorophényl-dichlorophosphite⁽¹¹⁾ avec le β-cyanoéthanol en présence de triméthylamine (TMA) donne le p-chlorophényl-bis-(β-cyanoéthyl)-phosphite 8⁽¹²⁾ qu'on oxyde en phosphate 9 par l'hydroperoxyde de tertiobutyle. Enfin, l'action de la TMA en excès pendant une heure à la température ambiante sur le p-chlorophényl-bis-(β-cyanoéthyl)-phosphate 9 en milieu acétonitrile conduit presque exclusivement au sel de triméthylammonium de l'acide p-chlorophényl-β-cyanoéthylphosphorique 10, à partir duquel le sel de cyclohexylammonium 10' a été facilement obtenu sous forme cristallisée (F : 118-119°C).



Notons que dans les conditions opérées, nous n'avons observé la formation ni du phosphonate 11, ni du p-chlorophénylphosphate 12 provenant respectivement de la décyanoéthylation du phosphite 8 et du diester 10. Cette plus grande stabilité des composés 8 et 10 vis-à-vis de la TMA par rapport au triester 9 peut être expliquée par la présence des groupements donneurs d'électrons (le doublet libre de l'atome du phosphore dans le phosphite 8 et la charge négative dans le diester 10). Ces résultats sont en bon accord avec ceux obtenus par Adamiak et coll.⁽¹³⁾ concernant la décyanoéthylation des nucléoside-3'-phosphotriesters par la triéthylamine.

La condensation du sel de cyclohexylammonium 10' (0,4 mmol) avec la 5'-O-mono-p-méthoxytritylthymidine 6a (0,2 mmol) en présence de TPS (0,6 mmol) dans la pyridine, conduit, après une nuit à la température ambiante, essentiellement au nucléoside 3'-phosphotriester totalement protégé 1a (> 90 %). Après avoir détruit l'excès de TPS par hydrolyse ménagée, le nucléotide 1a est extrait avec du chloroforme puis détritylé par l'acide benzènesulfonique⁽⁴⁾; la thymidine-3'-p-chlorophényl-β-cyanoéthyl-phosphate 2a est ensuite purifiée sur une courte colonne de gel de silice (CCM⁽¹⁴⁾, système B, Rf ≈ 0,42), le rendement de cette préparation est de l'ordre de 70 % par rapport au nucléoside 6a.

Schéma 3



- a : R = p-méthoxytrityle, B = thymine
 b : R = p-diméthoxytrityle, B = N-benzoyl-adénine
 c : R = p-diméthoxytrityle, B = N-anisoyl-cytosine

Lorsqu'on utilise le mésitylènesulfonyl-1-tétrazole (MSTe)⁽⁴⁾ à la place du TPS, la réaction de couplage est beaucoup plus rapide et elle est virtuellement terminée après une heure et demie à la température ambiante ; la CCM montre que le triester 1a obtenu à l'état brut après extraction est légèrement plus pur que celui obtenu précédemment avec le TPS.

Cette réaction réalisée avec la N-benzoyl-5'-O-di-p-méthoxytrityldéoxyadénosine 6b et la N-anisoyl-5'-O-di-p-méthoxytrityldéoxycytidine 6c est aussi terminée après deux heures à la température ambiante en présence de MSTe ; la CCM montre qu'on obtient aussi essentiellement une tache principale (> 95 %) correspondant aux nucléotides totalement protégés 1b et 1c. La détritylation de 1b et de 1c, suivie d'une purification sur silice conduit au N-benzoyl-déoxyadénosine-3'-p-chlorophényl-β-cyanoéthyl-phosphate 2b (CCM, système B, R_f ≈ 0,48) et au N-anisoyl-déoxycytidine-3'-p-chlorophényl-β-cyanoéthyl-phosphate 2c (CCM, système B, R_f ≈ 0,53) avec des rendements de l'ordre de 75-80 % par rapport aux nucléosides 6b et 6c.

La structure des nucléotides totalement protégés 1a, 1b et 1c a été déterminée, d'une part en identifiant ces composés avec des échantillons des mêmes produits 1'a, 1'b et 1'c obtenus par couplage du β-cyanoéthanol 7 avec les diesters 13'a, 13'b et 13'c préparés à partir du composé 4 selon Gough⁽⁹⁾ et Reese⁽¹⁵⁾ [CCM, système B, (1a, 1'a ; R_f ≈ 0,78), (1b, 1'b ; R_f ≈ 0,69), (1c, 1'c ; R_f ≈ 0,73)], et d'autre part en comparant les diesters 13a, 13b et 13c obtenus respectivement par décyanoéthylation de 1a, 1b et 1c par la triéthylamine⁽⁹⁾ avec des échantillons de diesters 13'a, 13'b et 13'c [CCM, système C, (13a, 13'a ; R_f ≈ 0,51), (13b, 13'b ; R_f ≈ 0,45), (13c, 13'c ; R_f ≈ 0,42)]. De plus, l'action de l'ammoniaque concentré pendant une nuit à la température ambiante sur le dérivé de la thymidine 1a conduit aussi au diester 13a sans qu'il y ait formation de 5'-O-mono-p-méthoxytritylthymidine-3'-phosphate détectable par CCM. Ces résultats montrent l'absence de dérivés bis-(β-cyanoéthyle) dans les triesters dissymétriques préparés 1.

Références et notes

1. A.M. Michelson et A.R. Todd, *J. Chem. Soc.*, 2632 (1955).
2. J.C. Catlin et F. Cramer, *J. Org. Chem.*, 38, 245 (1973).
3. K. Itakura, C.P. Bahl, N. Katagiri, J.J. Michniewicz, R.H. Wightman et S.A. Narang, *Can. J. Chem.*, 51, 3649 (1973).
4. J. Stawinski, T. Hozumi, S.A. Narang, C.P. Bahl et R. Wu, *Nucleic Acids Res.*, 4, 353 (1977).
5. T. Hirose, R. Crea et K. Itakura, *Tetrahedron Letters*, 2449 (1978).
6. W.L. Sung, H.M. Hsiung, R. Brousseau, J. Michniewicz, R. Wu et S.A. Narang, *Nucleic Acids Res.*, 7, 2199 (1979).
7. K. Itakura, N. Katagiri, C.P. Bahl, R.H. Wightman et S.A. Narang, *J. Amer. Chem. Soc.*, 97, 7327 (1975).
8. N. Katagiri, K. Itakura et S.A. Narang, *J. Amer. Chem. Soc.*, 97, 7332 (1975).
9. G.R. Gough, C.K. Singleton, H.L. Weith et P.T. Gilham, *Nucleic Acids Res.*, 6, 1557 (1979).
10. D. Molko, R.B. Derbyshire, A. Guy, A. Roget et R. Teoule, *Tetrahedron Letters*, 2159 (1980).
11. H. Tolkmith, *J. Org. Chem.*, 23, 1682 (1958).
12. a) On ajoute sous agitation à -10°C une solution benzénique (20 ml) de p-chlorophényldichloro-phosphite (0,05 mol) à une solution de β-cyanoéthanol (0,101 mol) et de TMA (35 ml d'une solution à 30 % en poids dans le benzène) dans l'éther (80 ml) ; l'addition terminée, on continue l'agitation 30 mn à 0°C et contrôle la fin de la réaction par l'absence de chlorure dans la phase liquide. On élimine le chlorhydrate par filtration et chasse l'excès de TMA et l'éther sous vide. Le phosphite 8 brut ainsi obtenu est relativement pur [CCM, système A, 1 tache principale (Rf ~ 0,5) + impureté (≈ 5 %, Rf ~ 0,8) ; RMN-¹H, CDCl₃, TMS = 0, δ = ppm, CH₂CN (4H, δ ~ 2,7), CH₂O (4H, δ ~ 4,3), Ar (4H, δ ~ 7,32)].
 b) A la solution de phosphite 8 brut (0,05 mol) dans le benzène (35 ml) on ajoute à 0°C l'hydroperoxyde de tertiobutyle (0,05 mol). Après 1 h à la température ambiante, on neutralise la solution avec du bicarbonate de sodium, détruit l'excès de l'hydroperoxyde de tertiobutyle par le thiosulfate d'ammonium, lave la phase benzénique avec de l'eau, la sèche sur Na₂SO₄, puis chasse le solvant sous vide et obtient le phosphate 9 sous forme d'huile [CCM, système A, Rf ~ 0,15 ; RMN-¹H, CH₂CN (4H, δ ≈ 2,72), CH₂OP (4H, δ ≈ 4,46), Ar (4H, δ ≈ 7,42)].
 c) On fait réagir pendant 1 h à la température ambiante le phosphate 9 avec 17 ml de solution de TMA à 30 % dans l'acétonitrile, après avoir chassé l'excès de TMA sous vide, on précipite le diester par l'éther et obtient le sel de triméthylammonium 10 sous forme de résidu visqueux. Le sel de cyclohexylammonium 10' peut être facilement obtenu sous forme cristallisée en ajoutant un léger excès de cyclohexylamine à une solution de sel de triméthylammonium dans l'acétonitrile, ce produit est ensuite purifié par recristallisation dans l'acétonitrile (F=118°C ; CCM, système C, Rf ≈ 0,45). Le rendement global de cette préparation est de l'ordre de 54 % par rapport au p-chlorophényldichlorophosphite.
13. R.W. Adamiak, M.Z. Barciszewska, E. Biala, K. Grzeskowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, W.T. Markiewicz et M. Wiwiorowski, *Nucleic Acids Res.*, 3, 3397 (1976).
14. CCM : Merck DC Alufolien Kieselgel, 60F 254, solvant : CH₂Cl₂ (système A) ; CH₂Cl₂, MeOH (9:1, v/v, système B, 6b, Rf ~ 0,52 ; iso-PrOH, Et₃N, H₂O (85:5:10, v/v, système C).
15. J.B. Chattopadhyaya et C.B. Reese, *Tetrahedron Letters*, 5059 (1979).

(Received in France 17 November 1980)