

PROTECTION DE LA LIAISON GLYCOSIDIQUE EN SERIE DESOXY-2' ADENOSINE

Christophe Morin

Unité de Chimie Organique, ERA 927, Institut Pasteur,*
28, rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cedex 15, France

Abstract. N-1 oxidation efficiently protects the acid labile glycosidic bond in the 2'deoxy adenosine series.

Depuis le premier nucléotide, préparé il y a une bonne soixantaine d'années par Fischer⁽¹⁾, la synthèse d'oligodésoxynucléotides, c'est-à-dire de fragments d'ADN, a maintenant atteint un régime de croisière : la stratégie retenue (méthode au phosphite ou au phosphate, synthèse "à la main" ou automatisée) en est désormais l'aspect principal⁽²⁾. Toutefois, il subsiste encore quelques points critiques parmi lesquels le problème de la dépurination, c'est-à-dire de la coupure éventuelle de la liaison glycosidique, au cours de la synthèse. Celle-ci a été mise en évidence dans la série la plus sensible, celle de la désoxy-2' adénosine, par Khorana et coll.⁽³⁾ lorsque le milieu réactionnel est acide, comme cela est rencontré lors de la déprotection du groupe trityle, généralement utilisé pour protéger la fonction en -5'. C'est la raison pour laquelle⁽⁴⁾ des efforts récents ont porté sur la recherche de nouvelles conditions de déblocage⁽⁵⁾ et, en particulier, sur l'utilisation des acides de Lewis⁽⁶⁾ suite aux travaux de Vasella⁽⁷⁾ ou encore des nitrites⁽⁸⁾. Une autre possibilité consiste à utiliser un nouveau type de groupe protecteur de la fonction alcool en -5' et c'est le sens des travaux de l'équipe de Reese⁽⁹⁾. Une troisième approche consiste à modifier la sensibilité de la liaison glycosidique, ce qui fait l'objet de la présente communication.

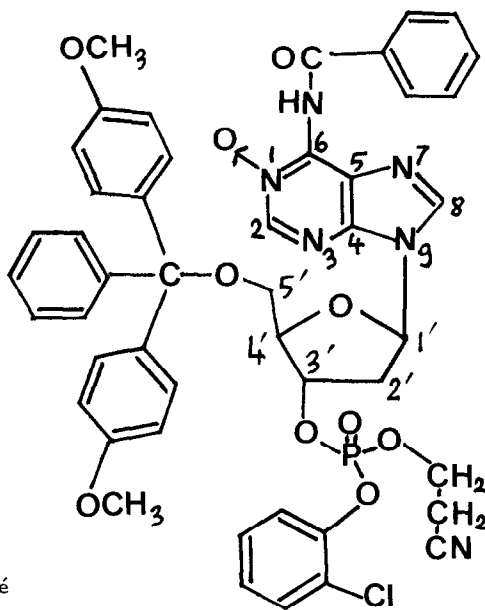
Le passage, par oxydation, d'un système hétérocyclique azoté au N-oxyde correspondant en modifie de manière importante la distribution électronique et la réactivité et c'est le cas, en particulier, des purines⁽¹⁰⁾ comme cela a été montré depuis les premiers travaux de Brown et coll.⁽¹¹⁾

La protection de la liaison glycosidique par N-oxydation de la base purique en série désoxy-2' adénosine a donc été envisagée.

* adresse actuelle : Laboratoire de Chimie Appliquée aux Organismes vivants, Muséum National d'Histoire Naturelle, 63, rue Buffon, 75005 Paris.

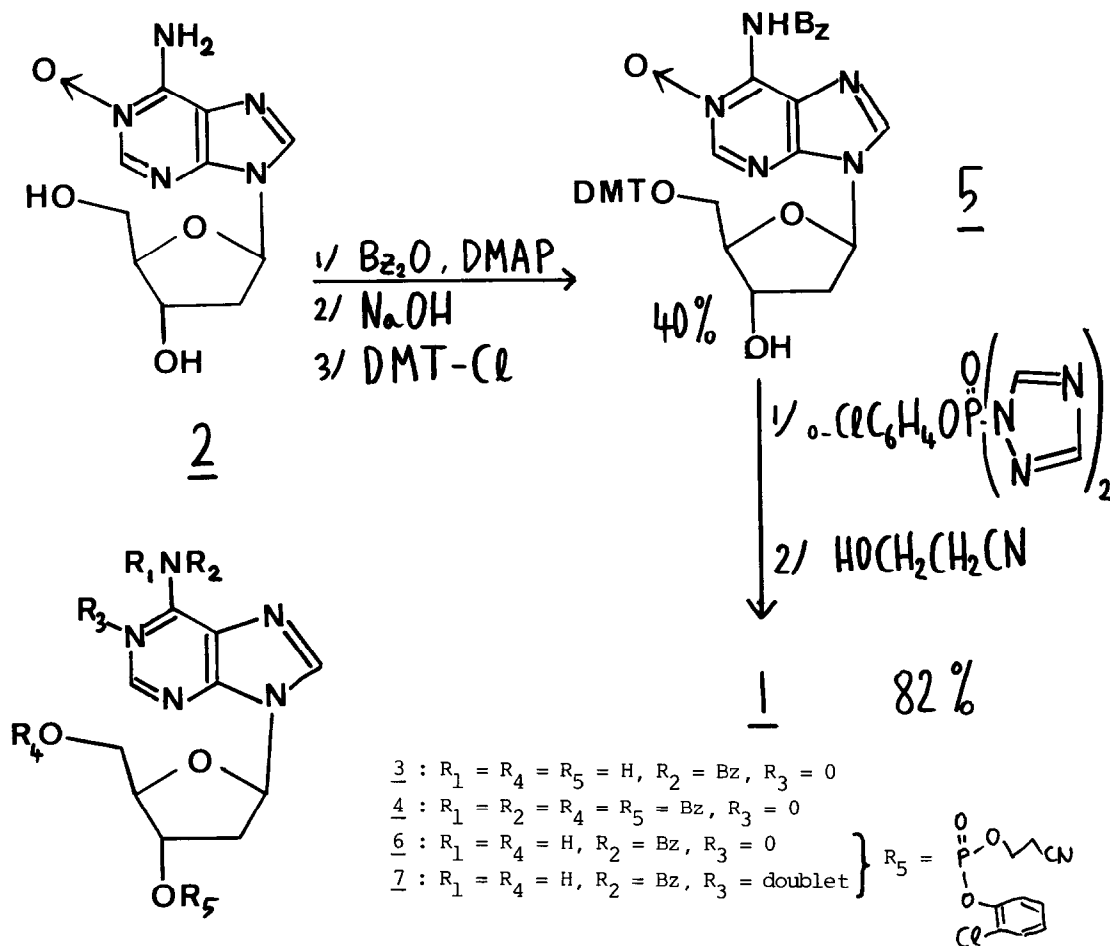
Le substrat d'étude retenu a été 1 ; en effet, celui-ci incorpore, d'une part, tous les groupes protecteurs et fonctions rencontrés lors de la synthèse d'oligodésoxynucléotides et, de plus, il s'agit d'un composé particulièrement sensible à une éventuelle dépurination : la présence d'un groupe acyle⁽¹²⁾ substituant la fonction aminée en -6, rend la protonation en -7 plus facile⁽¹³⁾ et donc la coupure de la liaison glycosidique⁽¹⁴⁾.

La synthèse de 1 à partir du N-1 oxyde de désoxy-2' adénosine 2⁽¹⁵⁾, obtenu par oxydation⁽¹⁵⁻¹⁶⁾ de la désoxy-2' adénosine, repose sur une méthodologie désormais classique en synthèse d'oligodésoxynucléotides. Le passage de 2 au dérivé N-6 benzoylé 3 s'effectue par perbenzoylation (Bz₂O, DMAP) - le dérivé tétrabenzoylé 4 pouvant être isolé à ce stade par cristallisation (55 %, F = 176-9°C (CH₂Cl₂ - EtOEt), δ H₂ = 9,0 ppm ; δ H₁, à 6,2 ppm, pseudo triplet J_{app.} = 7 Hz ; δ H₃, à 5,55 ppm) - suivie de coupure sélective des fonctions esters (NaOH-EtOH-Pyr ; 4°C). L'action du chlorure de p-diméthoxytrityle DMT-Cl sur le brut ainsi obtenu conduit à 5 (δ H₂ à 8,9 ppm ; δ H₁, à 6,15 ppm) avec un rendement global de 40 % depuis 2. La phosphorylation⁽¹⁷⁾ de la fonction alcool restante donne alors accès au mononucléotide 1 (82 % ; δ H₂ à 9,05 ppm ; δ H₁, à 6,15 ppm ; δ CH₂CN à 2,85 ppm, t, J = 6 Hz).



L'action de l'acide benzenesulfonique (qui est, parmi les agents acides utilisés lors de la déprotection de la fonction trityle, celui conduisant le plus facilement à une éventuelle dépurination⁽⁵⁾) donne accès (acide benzène sulfonique à 2 % dans CH₂Cl₂-CH₃OH 90/10 - quelques minutes), à un produit unique, 6, aucune dépurination ne pouvant être observée. La liaison glycosidique est donc stable dans ces conditions, ce qui montre l'efficacité de sa protection ; la N-oxydation s'ajoute ainsi aux différentes méthodes déjà proposées pour éviter la coupure adénine-désoxy-2' ribose lors de la déprotection du groupe p-diméthoxytrityle.

Toutefois, son applicabilité resterait limitée⁽¹⁸⁾ s'il n'était possible de retourner au système de départ, c'est-à-dire de procéder à la réduction du N-oxyde⁽¹⁹⁾. Deux méthodes se sont révélées performantes, un produit unique 7, comparé à un échantillon authentique⁽¹⁷⁾ étant obtenu : l'action de l'hexachlorodisilane⁽²⁰⁻²¹⁾ ou, mieux encore, pour des raisons pratiques, celle du phosphite de triméthyle⁽²²⁾. Appliquée à 1, 7 est également obtenu, la réduction s'accompagnant d'une détritylation. Ces réactions de désoxygénation, devant être effectuées à température ambiante en raison de la fragilité



des substrats, sont relativement lentes (quelques jours), mais nous avons observé que dans le second cas, la présence d'un excès de chlorure de cérium ($CeCl_3 \cdot 6H_2O$) rendait la désoxygénation ($(CH_3O)_3P-CH_2OH$ 50/50) complète en moins d'une journée.

REMERCIEMENTS. Nous remercions Monsieur Jean IGOLEN, Directeur de l'Unité, de l'intérêt porté à ce travail, Monsieur Kei-ichi ITAKURA (City of Hope, Cal. USA) pour de fructueuses discussions, Mademoiselle Ph. MITROU pour le travail de secrétariat et Monsieur Georges ROUSSI (ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette) pour un don d'hexachlorodisilane.

REFERENCES ET NOTES

1. E. Fischer, Chem. Ber. 47 3193 (1914).
2. C. Morin, l'Actualité Chim., sept. 1981, p. 29 ; R. Téoule, La Recherche, mars 1982, p. 340 ; L. Chausson, Biofutur, mars 1982, p. 41.

3. H. Shaller, G. Weimann, B. Lerch, H.G. Khorana, *J. Amer. Chem.* 85 3821 (1963).
4. La dépurination est un problème important dans la mesure où elle peut se produire à chaque traitement acide au cours de la synthèse d'une séquence d'ADN ; si x est la fraction du produit non dépuriné, à chaque traitement, le calcul montre qu'au bout de n traitements le pourcentage de séquence intacte devient $1-x^n$. Si $n = 5$ et $x = 0,95$ (soit 5 % de dépurination à chaque étape) on trouve 77 % de séquence correcte. (Ceci est valable bien sûr dans le cas où la séquence ne contient qu'un élément susceptible d'être dépuriné, dans le cas contraire le taux de séquence intacte est encore inférieur)
5. J. Stawinski, T. Hozumi, S.A. Narang, *Nucleic Acid Res.* 4 353 (1977) ; M.J. Gait, S.G. Popov, M. Singh, R.C. Titmas, *Nucleic Acid Res. Symp. Series* 7 243 (1980) ; M.L. Duckworth, M.J. Gait, P. Goelet, G. Fang Hong, M. Singh, R.C. Titmas, *Nucleic Acid Res.* 9 1691 (1981).
6. J. Igolen, C. Morin, *J. Org. Chem.* 45 4802 (1980) ; V. Kohli, H. Blöcker, H. Köster, *Tet. Letters* 21 2683 (1980) ; M.D. Matteucci, M.H. Caruthers, *Tet. Letters* 21 3243 (1980) ; K. Itakura, C. Morin, résultats non publiés (1980) ; R. Kierzek, H. Ito, R. Bhatt, K. Itakura, *Tet. Letters* 22 3761 (1981) ; H. Köster, N.D. Sinha, *Tet. Letters* 23 2641 (1982).
7. A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* 60 426 (1977).
8. Le nitrite de tertiobutyle déprotège facilement la fonction p-diméthoxytrityle en série désoxy-2' adénosine, C. Morin, résultats non publiés (1982) ; le mécanisme en est vraisemblablement analogue à celui proposé pour les thioacétals : voir K. Fuji, K. Ichikawa, E. Fujita, *Tet. Letters* 3561 (1978).
9. J.B. Chattopadhyaya, C.B. Reese, *Chem. Comm.* 639 (1978) ; J.B. Chattopadhyaya, C.B. Reese, A.H. Todd, *Chem. Comm.* 987 (1979).
10. Une mesure spectroscopique de la modification de la distribution électronique est donnée par la RMN de ^1H , en particulier par le déplacement de H_α à champ faible ; voir M. MacCoss, E.K. Ryu, R.S. White, R.L. Last, *J. Org. Chem.* 45 788 (1980).
11. M.A. Stevens, D.I. Magrath, H.W. Smith, G.B. Brown, *J. Amer. Chem. Soc.* 80 2755 (1958).
12. Ce groupe, en fait, n'est pas nécessaire pour la synthèse proprement dite : voir S.A. Narang, K. Itakura, R.H. Wightman, *Can. J. Chem.* 50 769 (1972).
13. Y. Maki, M. Suzuki, K. Kamesama, M. Sako, *Chem. Comm.* 658 (1981).
14. E.R. Garrett, P.J. Mehta, *J. Amer. Chem. Soc.* 94 8532 (1972) ; W. Kryzosiak, C.B. Reese, résultats non publiés cités par C.B. Reese, *Tetrahedron* 34 3183 (1978) ; J.L. York, *J. Org. Chem.* 46 2171 (1981).
15. H. Klenow, S. Frederiksen, *Biochem. Biophys. Acta* 52 384 (1961).
16. K. Kikugawa, H. Suehiro, R. Yanase, A. Aoki, *Chem. Pharm. Bull.* 25 1959 (1977).
17. C. Broka, T. Hozumi, R. Arentzen, K. Itakura, *Nucleic Acid Res.* 8 5461 (1980).
18. A. Eschenmoser, *Quarterly Reviews Chem. Soc.* 24 407 (1970).
19. A.R. Katritzky, J.M. Lagowski, *Chemistry of Heterocyclic N-oxides*, Academic Press, London & New-York, 1971, p. 170.
20. Si_2Cl_6 a été redistillé ; toutefois, cette opération a été qualifiée de dangereuse : cf. K. Naumann, G. Zon, K. Mislow, *J. Amer. Chem. Soc.* 91 7012 (1969).
21. V.D. Kummer, T. Seshradi, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 425 326 (1976) ; D.H.R. Barton, R. Beugelmans, R.N. Young, *Nouv. J. Chimie* 2 363 (1978) ; A.G. Hortmann, J. Koo, C.C. Yu, *J. Org. Chem.* 43 2289 (1978) ; F.R. Homaidan, C.H. Issidores, *Heterocycles* 16 411 (1981).
22. A.J. Boulton, A.C.G. Gray, A.R. Katritzky, *J. Chem. Soc.* 5958 (1965) ; M. Ackrell, M. Altaf-Urrahman, A.J. Boulton, R.C. Brown, *J. Chem. Soc. Perkin I* 1587 (1972) ; J.P. Dirlam, J.W. Mc Farland, *J. Org. Chem.* 42 1360 (1977) ; C. Kameko, A. Yamamoto, M. Gomi, *Heterocycles* 12 227 (1979).

(Received in France 6 August 1982)