

NOUVEAU GROUPEMENT LIPOPHILE PROTECTEUR DU PHOSPHATE
POUR LA SYNTHÈSE D'OLIGONUCLEOTIDES

J.J. Vasseur, B. Rayner et J.L. Imbach*

Laboratoire de Chimie Bio-Organique, E.R.A. n° 948 du C.N.R.S.
Université des Sciences et Techniques du Languedoc
Place E. Bataillon, 34060 Montpellier Cedex (France)

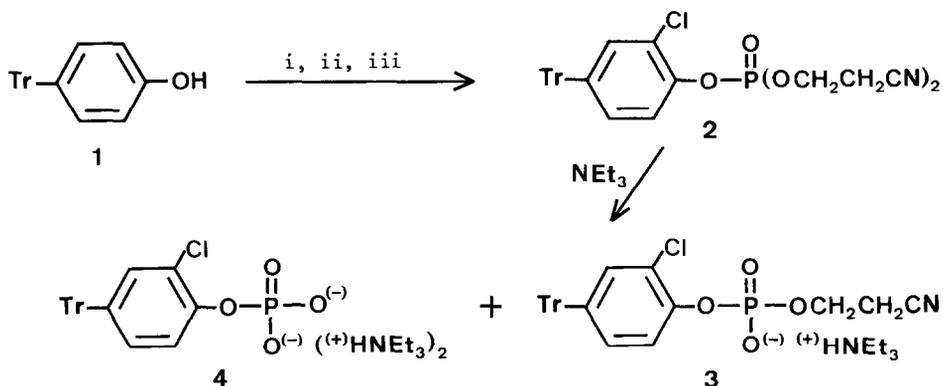
Summary. A new and highly lipophilic phosphate protecting group : 2-chloro-4-tritylphenyl was used in the phosphotriester approach for oligodeoxyribonucleotide synthesis. The four deoxyribonucleoside-3'-aryl-8-cyanoethyl phosphates were synthesized in high yield in a simple step from the nucleoside derivatives. This new phosphate protecting group facilitated purification and enhanced the yields of the fully protected intermediates during preparation of T(pT)₉.

Lors de la préparation, selon la méthode au phosphotriester classique¹ en phase liquide d'oligodésoxyribonucléotides de longueur supérieure à 6 ou 8 unités nucléotidiques, des difficultés d'extraction et de purification apparaissent^{2,3} qui augmentent de façon dramatique avec la longueur de la chaîne nucléotidique entièrement protégée (spécialement pour des fragments riches en thymine et en guanine). Ces difficultés résultent d'une augmentation de la polarité de ces oligomères et, par conséquent, d'une diminution de leur solubilité dans les solvants organiques et se traduisent par des baisses importantes des rendements en produits isolés lors des purifications par chromatographie sur gel de silice².

Une solution à ce problème consiste à introduire des groupements protecteurs apportant un fort caractère lipophile aux oligonucléotides en croissance et qui sont gardés tout au long de la synthèse. Ces groupements peuvent être introduits à deux niveaux : a) lors de la protection des résidus hétérocycliques³⁻⁹ ; b) et/ou lors de la protection des phosphates internucléotidiques. La recherche d'un accroissement de lipophilie apportée au niveau de la protection du phosphate a été peu développée à ce jour¹⁰. Cependant, l'utilisation d'un nouveau groupement protecteur du phosphate, présentant un fort caractère lipophile, nous est apparue particulièrement intéressante, dans la mesure où ce même groupement peut être introduit régulièrement sur la chaîne oligonucléotidique en croissance autant de fois que celle-ci contient d'unités nucléotidiques.

Dans ce but, nous proposons le chloro-2 trityl-4 phényle comme groupement protecteur des phosphates internucléotidiques et nous décrivons la préparation des quatre synthons désoxyribonucléotidiques $\tilde{5}$ en une seule étape par l'intermédiaire d'un réactif mono-fonctionnel :

le (chloro-2 trityl-4 phényl) β -cyanoéthyl phosphate de triéthylammonium 3 dont la préparation a été réalisée selon le schéma I avec un rendement global de 46 %.

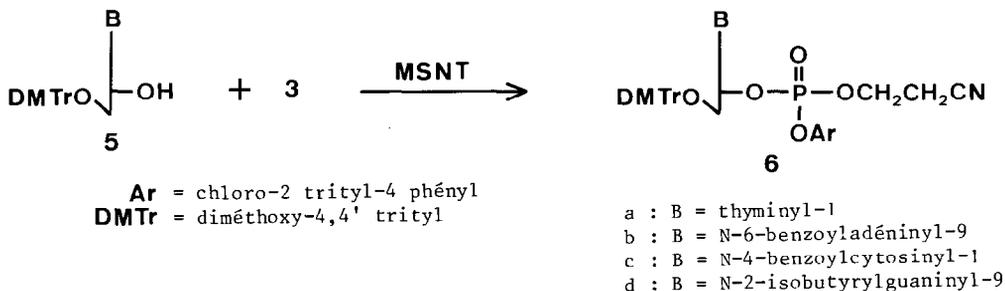


Tr = trityl

i : N-chloroacétamide/HCl aqueux/dioxanne ; ii : POCl₃/éthyl-1 méthyl-2 chloro-5 imidazole ; iii : β -cyanoéthanol/pyridine.

SCHEMA I.

La dernière étape est le point critique de cette synthèse. En effet, si le traitement de l'aryl bis-cyanoéthyl phosphate 2 par une solution de triéthylamine (1,8M, 7,7 équivalents molaires)



SCHEMA II.

dans de la pyridine anhydre, pendant une heure à température ambiante, donne de façon prépondérante le sel cristallin de triéthylammonium attendu 3¹¹ avec un rendement de 65 %, on note la formation en faible proportion (5-10 %) d'un composé plus polaire correspondant au arylphosphate 4 et qui provient d'une élimination partielle des 2 groupements cyanoéthyles.

La condensation du phosphate de triéthylammonium 3 (1,1 mmole) avec la 0-diméthoxytrityl-5' thymidine 5a (1 mmole) en présence de mésitylsulfonyl-1 nitro-3 triazole-1,2,4¹² (MSNT, 2,2 mmole) dans de la pyridine anhydre (5 ml) à température ambiante pendant 1 heure, conduit essentiellement au désoxyribonucléoside phosphotriester-3' 6a entièrement protégé (Schéma II). Celui-ci est isolé après extraction et purification par chromatographie sur courte colonne de gel de silice avec un rendement de 80 %. Les résultats de l'analyse élémentaire et des spectres de RMN de ¹H et ³¹P confirment la structure du composé obtenu. D'une façon analogue, les désoxyribonucléosides phosphotriesters-3' entièrement protégés 6b, 6c et 6d ont été obtenus avec des rendements respectifs de 90, 94 et 67 %.

Pour illustrer l'efficacité de ce nouveau groupement protecteur du phosphate : chloro-2 trityl-4 phényle, nous avons effectué la synthèse du décathymidine nonaphosphate à partir du synthon 6a et de la 0-benzoyl-3' thymidine (Tableau I). La méthode utilisée pour cette synthèse est essentiellement celle décrite par Narang et col.¹³. Au préalable, à chaque étape d'élongation, il est nécessaire de déprotéger sélectivement, d'une part l'extrémité OH-5' d'un nucléotide ou oligonucléotide entièrement protégé par action d'acide benzènesulfonique à 2 % dans un mélange chloroforme-méthanol et, d'autre part, l'extrémité phosphodiester-3' d'un autre dérivé nucléotidique ou oligonucléotidique entièrement protégé par élimination du groupement β-cyanothyl avec de la triéthylamine en solution dans un mélange eau-pyridine (1/9, v/v). Dans chaque cas, on a vérifié par CCM que la protection chloro-2 trityl-4 phényle était intégralement préservée au cours de ces précédents traitements. Le MSNT a été utilisé comme agent de couplage.

Tableau I. Résultats des réactions de couplage obtenus lors de la synthèse de (Tp)₉T entièrement protégé.

Composé phosphodiester-3' (mmoles)	Composé hydroxyl-5' (mmoles)	MSNT (mmoles)	Temps de réaction (mn)	Produit obtenu	Rendement %
DMTr Tp ^o 6a (0,51)	T Bz (0,46)	1,27	60	DMTr Tp ^o T Bz 7	88
DMTr Tp ^o Tp ^o (0,40)	Tp ^o Tp ^o CNE (0,36)	1,0	55	DMTr T(p ^o T) ₃ ^o CNE	85
DMTr T(p ^o T) ₃ ^o (0,15)	Tp ^o T Bz (0,18)	0,75	40	DMTr T(p ^o T) ₄ ^o T Bz	78
DMTr T(p ^o T) ₃ ^o (0,11)	(Tp ^o) ₅ T Bz (0,10)	1,3	40	DMTr T(p ^o T) ₈ ^o T Bz 8	72

Bz : benzoyl ; CNE : β-cyanoéthyl , p^o : chloro-2 trityl-4 phényle phosphate

Le gain de lipophilie apporté par les groupements chloro-2 trityl-4 phényles a très nettement facilité la purification des oligonucléotides obtenus sous forme entièrement protégée par extraction et chromatographie rapide sur colonne de gel de silice. Ceci s'est traduit par de bons rendements en produits isolés (Tableau I). La déprotection des phosphates internucléotidiques a été effectuée par action du nitro-4 benzaldoximate de tétraméthylguanidinium sur le décanucléoside nonaphosphate T(pT)₉ entièrement protégé 8, pendant 16 heures à température ambiante, selon la procédure décrite par Reese et col.¹⁴. Des essais préalables effectués sur le dinucléo-

side monophosphate entièrement protégé TpT 7 ont montré que l'action d'une solution 0,3M de nitro-4 benzaldoximate de tétraméthylguanidinium dans un mélange eau-dioxanne (1/1, v/v) à température ambiante, permet d'enlever totalement la protection chloro-2 trityl-4 phényle en moins de 2 heures (le temps de demi-réaction a été estimé entre 10 et 15 mn par CCM). Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus avec le groupement chloro-2 phényle¹⁴ et montrent que celui-ci peut être avantageusement remplacé par le groupement chloro-2 trityl-4 phényle pour la protection du phosphate.

Enfin, la déprotection totale du décathymidine nonaphosphate a été achevée par l'action d'ammoniaque concentré pendant 5 heures en tube scellé à 50°, puis par traitement avec un mélange acide acétique-eau (8/2, v/v). Après purification sur colonne de DEAE-Sephadex, le composé obtenu a été caractérisé¹⁵. Le développement de cette nouvelle protection du phosphate est actuellement en cours pour la synthèse d'oligodésoxyribonucléotides dont les séquences comportent les quatre bases.

Références et notes

1. Pour une revue, voir C.B. Reese, *Tetrahedron*, 34, 3143 (1978).
2. J.F.M. de Rooij, R. Arentzen, J.A.J. Den Hartog, G. Van der Marel et J.H. Van Boom, *J. of Chromatography*, 171, 453 (1979).
3. J.B. Chattopadhyaya et C.B. Reese, *Nucleic Acids Res.*, 8, 2039 (1980) et références citées.
4. R.W. Adamiak, R. Arentzen et C.B. Reese, *Tetrahedron Lett.*, 1431 (1977).
5. J.B. Chattopadhyaya et C.B. Reese, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 639 (1978).
6. S.S. Jones, C.B. Reese, S. Sibanda et A. Ubasawa, *Tetrahedron Lett.*, 22, 4755 (1981).
7. B.L. Gaffney et R.A. Jones, *Tetrahedron Lett.*, 23, 2257 (1982).
8. B.E. Watkins, J.S. Kiely et H. Rapoport, *J. Amer. Chem. Soc.*, 104, 5702 (1982).
9. M. Sekine, J. Matsuzaki et T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, 23, 5287 (1982).
10. R. Arentzen, C.A.A. Van Boekel, G. Van der Marel, J.H. Van Boom, *Synthesis*, 137 (1979).
11. F : 134-136° (acétate d'éthyle-éther éthylique) ; ³¹P (chloroforme) δ(ppm) : -6,57 (par rapport à la référence externe H₃PO₄ 5 %) ; ¹H (deutériochloroforme) δ(ppm) : 2,68 (t, CH₂CN), 4,22 (m, O-CH₂), 7,22 (m, 18 protons aromatiques).
12. S.S. Jones, B. Rayner, C.B. Reese, A. Ubasawa et M. Ubasawa, *Tetrahedron*, 36, 3075 (1980).
13. K. Itakura, C.P. Bahl, N. Katagiri, J.J. Michniewicz, R.H. Wightman et S.A. Narang, *Can. J. Chem.*, 51, 3649 (1973) ; J. Stawinski, T. Hozumi, S.A. Narang, C.P. Bahl et R. Wu, *Nucleic Acids Res.*, 4, 353 (1977) ; W.L. Sung, H.M. Hsiung, R. Brousseau, J. Michniewicz, R. Wu et S.A. Narang, *Nucleic Acids Res.*, 7, 2199 (1979).
14. C.B. Reese et L. Zard, *Nucleic Acids Res.*, 9, 4611 (1981).
15. Le décanucléotide obtenu a été entièrement dégradé sous l'action de la phosphodiesterase de *Crotalus durissus terrificus* en thymidine et thymidine phosphate-5' dans un rapport 1/9.

(Received in France 18 March 1983)