

SYNTHESE D'OLIGONUCLEOTIDES LIES DE FACON COVALENTE A UN SUPPORT SOLIDE

S. Pochet, T. Huynh-Dinh et J. Igolen

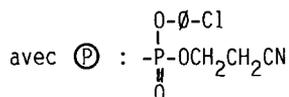
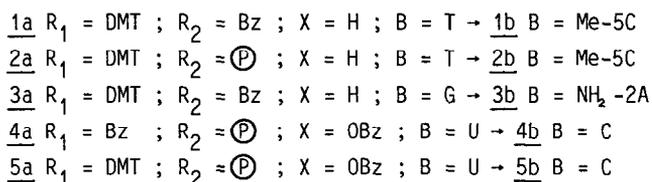
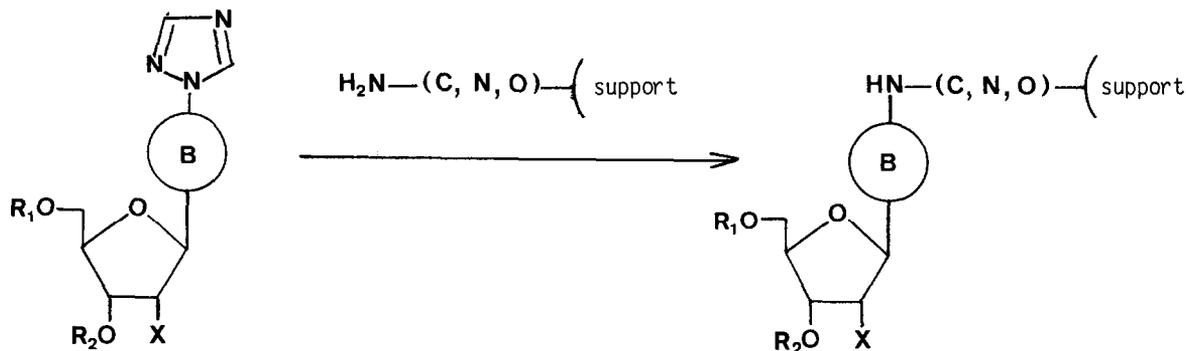
Unité de Chimie Organique, Département de Biochimie et Génétique Moléculaire, ERA-CNRS 927,
INSTITUT PASTEUR, 28, rue du Docteur Roux, 75724 PARIS Cedex 15 (France)

Abstract : A method for the preparation of unprotected oligonucleotides, which remain anchored by a covalent linkage to a solid support, is described. Synthesis of several sequences up to a 18-mer by the phosphotriester method is reported.

Développée depuis à peine vingt ans¹, la synthèse en phase solide d'oligoribo- ou désoxyribo- nucléotides présente l'avantage sur la phase liquide de supprimer les nombreuses étapes de purification des oligomères intermédiaires et d'être ainsi une méthode de synthèse simple et rapide. L'automatisation de cette technique en série désoxyribose en est l'illustration. Le choix du support est déterminant (solubilité, hydrophilie, porosité, gonflement...), selon la méthode de synthèse utilisée : phosphodiester, phosphotriester ou phosphoramidite. Divers polymères ont été étudiés : polystyrène², cellulose³, polyéthylèneglycol⁴, polydiméthylacrylamide⁵, polyacrylmorpholide⁶, silice⁷, billes de verre⁸ ... L'accrochage du premier nucléotide au support se fait le plus souvent sur l'hydroxyle en 3' après activation (élongation de la chaîne dans le sens 3' → 5'), ou sur le groupe trityl en 5'^{2e-f,6d} (élongation dans le sens 5' → 3'). Dans les deux cas, l'oligomère ainsi construit est libéré du support lors des réactions de déprotection. L'ancrage par un ribonucléotide proposé récemment^{8a}, s'avère extrêmement intéressant. La fonctionnalisation du polymère est ainsi réduite à un seul nucléotide quelque soit la séquence voulue. Après décrochage de l'oligomère, le résidu ribonucléique est éliminé par oxydation au periodate suivie d'une β-élimination⁹, ou par action d'ions Pb²⁺ + 8c,10.

Nous décrivons ici une méthode de préparation de fragments d'oligonucléotides totalement déprotégés et liés de façon covalente à un support. La liaison entre le premier nucléotide et le support est assurée par le sommet C-4 d'une pyrimidine ou C-6 d'une purine. Tout support répondant aux critères classiques de la méthode au phosphotriester ou phosphoramidite convient, par ex. polyacrylmorpholide, billes de verre, silice. Le bras est constitué d'une chaîne carbonée de longueur variable (4 à 20 atomes) pouvant comporter des hétéroatomes (O, N). Celui-ci est, soit inhérent au support commercial (Pierce, CPG-AALC, diamètre des pores 500 Å, taille des particules 125 μ), soit synthétisé par condensation d'une diamine (diamino-1, 10

décane, éthylènediamine, spermine) sur le polyacrylmorpholide^{6a} (Enzacryl Gel K-2) ou de la triéthoxysilylpropylamine^{7e} sur la silice.



L'activation de la base sur les sommets 4 ou 6 est effectuée de façon classique par un dérivé hétérocyclique¹¹. Nous avons utilisé le triazole-1,2,4. Les dérivés $\underline{3a}$, $\underline{4a}$ et $\underline{5a}$ sont préparés selon la méthode utilisée pour les composés $\underline{1a}$ et $\underline{1b}$ ^{11c} : 2 équivalents d'o.chlorophénylphosphorodichloridate et 4 équivalents de triazole-1,2,4 dans la pyridine anhydre, avec des rendements de 68 %, 82 % et 79 % respectivement. Dans un premier temps, la substitution de ces nucléosides activés par des diamines aliphatiques modèles (diamino-1,6 hexane, diamino-1,10 décane), est étudiée en solution dans le dioxanne. En accord avec la littérature¹¹, on observe les dérivés monoalcoylés. Compte tenu de ces résultats, le support est laissé au contact du nucléoside activé dans le dioxanne ou la pyridine pendant plusieurs jours, puis il est essoré et rincé abondamment (dioxanne ou méthanol). Les fonctions amines non substituées sont ensuite bloquées, avant toute étape de couplage, par traitement à l'anhydride acétique dans la pyridine (1/9) ou le chloroformate d'isobutyle suivi du chlorure de triméthylsilyle (test négatif à la ninhydrine). Le degré de substitution des différents supports est évalué par dosage à 507 nm du groupe diméthoxytrityl. Les résultats sont consignés dans le tableau.

TABLEAU

Polymère	Bras	Nucléoside	Tps de contact (jour)	Substitution $\mu\text{mole/g}$	Support N°
polyacryl-morpholide	diamino-1,10 décane	<u>1a</u>	8	63	1
"	diamino-1,10 décane	<u>2a</u>	20	71	2
"	diamino-1,10 décane	<u>4a</u>	25	29	3
"	diamino-1,2 éthane	<u>2a</u>	14	32	4
"	spermine	<u>1a</u>	13	94	5
Silice 7734 Merck	3-amino propane	<u>1a</u>	20	85	6
Silice porasil Waters (37-75 μ)	"	<u>3a</u>	20	16	7
CPG-AALC Pierce	amine à longue chaîne	<u>1a</u>	16	25	8
CPG-AALC Pierce	"	<u>5a</u>	17	10	9

• dosage effectué après acétylation des fonctions amines non substituées puis couplage avec $\text{DMT}_{\text{T}_{\text{Bz}}}$ en présence de tri-isopropylsulfonyl-nitrotriazole (TPSNT).

Ce type d'accrochage laisse libre les fonctions hydroxyles du sucre et permet ainsi l'élongation de la chaîne nucléotidique dans le sens 3' \rightarrow 5' (supports n° 1, 5, 6, 7 et 8) ou 5' \rightarrow 3' (support n° 3) ou indifféremment dans les deux sens (supports n° 2, 4 et 9).

La stabilité de la liaison nucléoside-support vis-à-vis des conditions de déblocage (TMGPAO^{12} , NH_4OH , H^+) est vérifiée pour les différents types de support. Ainsi le chauffage dans l'ammoniaque concentrée à 50°C pendant 5 h n'altère en rien les supports 1 et 8, le dosage du diméthoxytrityle reste constant. Après une nuit à 50°C, on constate une perte de capacité de 10 % pour le support 1 alors qu'elle reste inchangée pour le support 8. Le contrôle des filtrats par CLHP¹³ confirme ces résultats. Le support 8 (200 mg, 25 $\mu\text{moles/g}$) est utilisé pour synthétiser un 18-mère ($^5\text{T}_{\text{CG}_3\text{T}_{12}}^{\text{MeC}}$ -support) selon la méthode au phosphotriester (rendement moyen de couplage de 85 %). Après déblocage des groupements protecteurs, la séquence est vérifiée par hydrolyse du support dans l'acide chlorhydrique 2N pendant 5 heures. On retrouve dans le filtrat les trois bases utilisées dans un rapport convenable (dosage CLHP)¹³.

L'ancrage par un ribonucléotide (supports 3 et 9) permet de décrocher si nécessaire le fragment synthétisé, dans des conditions autres que celles utilisées pour la déprotection des séquences^{8a,9,10}. Ainsi sur le support 9 (35 mg, 10 $\mu\text{moles/g}$) a été synthétisé le tétramère (T_p)₃T. Après déprotection classique des phosphates, le traitement de ce support par la soude 2N permet de décrocher sans altération le tétramère. Le filtrat est contrôlé par CLHP¹³ en

présence d'un témoin (T_p)₃T synthétisé de façon classique (temps de rétention de 8.93 mn).

Cette méthode permet de disposer d'oligonucléotides déprotégés ancrés de façon covalente à un support. La construction des séquences peut se faire indifféremment dans les deux sens : 3' → 5' et 5' → 3'. L'ancrage par un ribonucléotide permet de décrocher chimiquement la séquence au moment voulu. Ces supports devraient être d'excellents outils pour la biologie moléculaire (chromatographie d'affinité, sonde ancrée ...).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R.L. Letsinger et V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 3526.
- 2a H. Köster, A. Pollak et F. Cramer, *Liebigs Ann. Chem.*, 1974, 959.
- b V. Potapov, V. Veiko, O. Koroleva et Z. Shabarova, *Nucleic Acids Res.*, 1979, **6**, 2041.
- c K-I. Miyoshi et K. Itakura, *Nucleic Acids Res. Symposium Ser. n° 7*, 1980, 281.
- d K-I. Miyoshi, R. Arentzen, T. Huang et K. Itakura, *Nucleic Acids Res.*, 1980, **8**, 5507.
- e R. Belagaje et C.K. Brush, *Nucleic Acids Res.*, 1982, **10**, 6295.
- f A. Rosenthal et D. Cech, *Tetrahedron Letters*, 1983, 1691.
- 3a T. Horn, M.P. Vasser, M.E. Struble et R. Crea, *Nucleic Acids Res. Symposium Ser. n° 7*, 1980, 225.
- b R. Crea et R. Horn, *Nucleic Acids Res.*, 1980, **8**, 2331.
- 4 H. Köster, *Tetrahedron Letters*, 1972, 1535.
- 5a M.J. Gait et R.C. Sheppard, *Nucleic Acids Res.*, 1977, **4**, 4391.
- b M.J. Gait, S.G. Popov, M. Singh et R.C. Titmas, *Nucleic Acids Res. Symposium Ser. n° 7*, 1980, 243.
- c M.L. Duckworth, M.J. Gait, P. Goelet, G.F. Hong, M. Singh et R.C. Titmas, *Nucleic Acids Res.*, 1981, **9**, 1691.
- 6a Ch. K. Narang, K. Brunfeldt et K.E. Norris, *Tetrahedron Letters*, 1977, 1819.
- b K.I. Miyoshi et K. Itakura, *Tetrahedron Letters*, 1979, 3635.
- c K.I. Miyoshi, T. Miyake, T. Hozumi et K. Itakura, *Nucleic Acids Res.*, 1980, **8**, 5473.
- d K.E. Norris, F. Norris et K. Brunfeldt, *Nucleic Acids Res. Symposium Ser. n° 7*, 1980, 233.
- e P. Dembek, K.I. Miyoshi et K. Itakura, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 706.
- f E. Ohtsuka, H. Takashima et M. Ikehara, *Tetrahedron Letters*, 1981, 765.
- 7a H. Köster, *Tetrahedron Letters*, 1977, 1819.
- b M.H. Caruthers, S.L. Beaucage, J.W. Efcavitch, E.F. Fisher, M.D. Matteucci et Y. Stabinsky, *Nucleic Acids Res. Symposium Ser. n° 7*, 1980, 215.
- c K.K. Ogilvie et M.J. Nemer, *Tetrahedron Letters*, 1980, 4159.
- d M.D. Matteucci et M.H. Caruthers, *Tetrahedron Letters*, 1980, 719 et *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 3185.
- e F. Chow, T. Kempe et G. Palm, *Nucleic Acids Res.*, 1981, **9**, 2807.
- 8a G.R. Gough, M.J. Brunden et P.T. Gilham, *Tetrahedron Letters*, 1981, 4177 et 1983, 5321.
- b H. Köster, A. Stumpe et A. Walter, *Tetrahedron Letters*, 1983, 747.
- c H. Köster, J. Biernat, J. Mc Manus, A. Wolter, A. Stumpe, Ch. K. Narang et N.D. Sinha, *Tetrahedron*, 1984, **1**, 103.
- 9 G. Keith et P.T. Gilham, *Biochemistry*, 1974, **13**, 3601.
- 10 G.R. Gough, M.J. Brunden et P.T. Gilham, *Tetrahedron Letters*, 1983, 5317.
- 11a C.B. Reese et A. Ubasawa, *Tetrahedron Letters*, 1980, 2265.
- b W.L. Sung, *Nucleic Acids Res.*, 1981, **9**, 6139.
- c W.L. Sung, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 3623.
- d A.-F. Maggio, M. Lucas, J.-L. Barăscut et J.-L. Imbach, *Tetrahedron Letters*, 1984, 3195.
- 12 TMGPAO : tétraméthylguanidine-pyridine aldoximate (1-1/0,3 M dans eau : dioxane/1:1).
C.B. Reese et L. Zard, *Nucleic Acids Res.*, 1981, **9**, 4611.
- 13 Chromatographie Perkin-Elmer (Séries 3B) ; colonne HS-5 C18, Perkin-Elmer, 5 µm long.
12,5 cm ; gradient linéaire d'acétonitrile dans un tampon 0,01 M triéthylammonium acétate.
pH 6,5 de 5 à 25 % en 20 minutes.

(Received in France 28 October 1984)