0040-4039/85 \$3.00 + .00 ©1985 Pergamon Press Ltd.

L'ION BENZOHYDROXAMATE : NOUVEAU REACTIF DE DESARYLATION EN SYNTHESE D'OLIGONUCLEOTIDE

U. Asseline et N.T. Thuong

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

<u>Summary</u> : Benzohydroxamate ion in aprotic solvent removes selectively the aryl masking group of oligonucleotide-aryl-phosphotriesters.

Les aldoximates de tétraméthylguanidinium(TMG) introduits par Reese et coll. (1,2) pour débloquer les groupes esters arylés d'oligonucléotides <u>1</u> représentent un progrès remarquable par rapport aux autres réactifs nucléophiles tels que les ions hydroxyle et fluorure qui provoquent d'importantes ruptures de la chaîne nucléotidique.



Miller et coll. ^(3,4) ont cependant observé que la pyridine-2 aldoximate de TMG conduit à beaucoup plus de rupture de liaisons internucléotidiques que le fluorure de tétrabutylammonium ⁽⁵⁾ lorsque l'oligodésoxynucléotide est modifié et comporte des groupes méthylphosphonates ou un groupe éthylphosphate en plus des groupes arylphosphates.

En vue de mettre au point un nouveau système de désarylation sélective des esters arylés d'oligodésoxynucléotides, nous avons essayé l'ion benzohydroxamate dont l'effet catalytique a été signalé dans l'hydrolyse d'organophosphorés anticholinestérasiques ⁽⁶⁻⁸⁾.

Nous décrivons la désarylation d'oligothymidylate-3' éthylphosphotriester ⁽⁹⁾ (DMTr)d $(T^{\pm})_n$ Et, du dodécanucléotide (DMTr)dT \pm T \pm T \pm T \pm T \pm C^{an} \pm G^{ib} \pm C^{an} \pm G^{ib} \pm T \pm T \pm T \pm T \pm T \pm T Bz et de l'octanucléotide (DMTr) dT \pm T \pm A^{bz} \pm T \pm C^{an} \pm A^{bz} \pm G^{ib} \pm G^{ib} \pm C^{ib} Bz (\pm = p-chlorophénylphophotriester) par l'ion benzohydroxamate en comparant pour ce dernier exemple avec le p-nitrobenzaldoximate de TMG. Les oligodesoxynucléotides utilisés pour cette étude ont été préparés selon la méthode au phosphotriester en solution ⁽¹⁰⁻¹²⁾. Les essais de désarylation ont été réalisés à la température ambiante en utilisant 10 équivalents du couple acide benzohydroxamique, 1-8 diazabicyclo (5-4-0 undec-7 ène) (ABH-DBU) (solution IM en ABH et en DBU dans la pyridine anhydre) ou du p-nitrobenzaldoximate de TMG ^(1,2) par rapport au nombre de groupes "arylphosphate" à déprotéger.

La déprotection de tous les groupes "arylphosphotriester" peut être déterminée par chromatographie sur couche mince en utilisant les systèmes A et B (13) et en vérifiant l'absence de groupe "arylphosphate" dans les composés ioniques formés (13b). Dans ces conditions on observe que le temps nécessaire pour obtenir une désarylation complète des oligomères est de l'ordre de 25 mn pour un mononucléotide et de 48 heures pour un dodécanucléotide. Après complète désarylation puis 1006

déprotection totale (14)les composés bruts obtenus sont analysés et purifiés par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (15).

La désarylation des oligothymidylates par le système ABH-DBU en milieu aprotique (fig. 1,2,3) conduit essentiellement aux oligonucléotides correspondants avec des rendements respectivement voisins de 94, 89 et 85 %. L'analyse en phase inverse du dodécathymidylate (fig. 4) ⁽¹⁶⁾ indique l'absence d'ester arylé $(T-)_{12}$ Ar (absence de pic possédant un temps de rétention supérieur à celui de $(T-)_{12}$ Et). Ce qui montre que la désarylation par l'ion benzohydroxamate est très sélective et ne touche pratiquement pas le groupe ester éthylé. Les composés obtenus sont dégradés par l'exonucléase extraite de la rate de veau en thymidine-3' phosphate par contre le venin de serpent (*crotalus adamenteus*) est inactif du fait du blocage de l'hydroxyle-3' terminal.



Figure 1, 2 et 3 - Chromatogrammes des oligonucléotides (T-)_n Et (n = 4, Fig. 1), (n = 8, Fig. 2) et (n = 12, Fig. 3) sur colonne échangeuse d'ions. Colonne Polyanion, SI HR 5/5 (Pharmacia Fine Chemicals) 5 x 50 mm. Solvant A : 0,001 M KH₂PO₄, pH 6. Solvant B : 1 M KH₂PO₄, pH 6, débit : 1 ml/mn ; température 20°C, détecteur 254 nm, gradient : 0 - 38 %, solvant B, 15 mn.



<u>Figure 4</u> - Chromatogramme du dodécanucléotide $(T-)_{12}$ Et en phase inverse sur une colonne C₁₈ (MicroPak-SPC 18) (Merck). Reverse Phase Column (45 mm x 15 cm). Solvant A : acétate de triéthylammonium 0,06 M dans CH₃CN/H₂0, 2:98, v/v, pH 5,9. Solvant B : acétate de triéthylammonium 0,054 dans CH₃CN/H₂0, 24:76, v/v, pH 5,9. Débit 1,2 ml/mn, 10 % B isochratique, température 20°C, détecteur : 254 nm.

TEMPS DE RETENTION EN nm -

Dans le cas de l'octanucléotide dT-T-A-T-C-A-G-G pour lequel la désarylation comparative a été réalisée (l'étape de désarylation a été maintenue pendant 48 heures puis la déprotection totale a été achevée selon le même procédé dans les deux cas) ⁽¹⁴⁾ les résultats obtenus par les deux méthodes sont peu différents (fig. 5) avec des rendements respectivement voisins de 80 % avec l'ion benzohydroxamate et de 75 % avec la p-nitrobenzaldoxime ⁽¹⁷⁾.

Il est admis que la désarylation par les oximes conduit à peu de ruptures internucléotidiques (1,18). Les chromatogrammes de la figure 5 indiquent pour les deux méthodes la présence de plusieurs produits tronqués en proportions identiques $(T_R \approx 6 \text{ mn})$ ou légèrement différentes $(T_R \approx 10 \text{ mn})$. Ces produits secondaires peuvent provenir soit des ruptures internucléotidiques au cours de la déprotection soit de la présence de produits plus courts accompagnant l'oligonucléotide totalement protégé dont la purification absolue est souvent difficile à réaliser (12,18,19). Il convient de remarquer que dans le cas des oligothymidylates (fig. 2 et 3) certains produits secondaires possèdent des temps de rétention correspondant aux "blocs" utilisés au cours de la synthèse $\left[(T^{\pm})_n \text{ Et}, (T_R = 6 \text{ mn}, n = 4) \text{ et} (T_R = 10 \text{ mn}, n = 8) \right]$. Le chromatogramme de la figure 6 confirme que l'ion benzohydroxamate permet la déprotection du dodécanucléotide : (DMTr) dT \pm T \pm T \pm C^{an} \pm G^{ib} \pm C^{an} \pm G^{ib} \pm T \pm T \pm T \pm T \pm T \pm T sans ruptures internucléotidiques importantes $^{(17)}$.



Figure 5 et 6 - Chromatogrammes de l'octanucléotide dT-T-A-T-C-A-G-G (Fig. 5 a) ABH, b) oxime) et du dodécanucléotide dT-T-T-T-C-G-C-G-T-T-T-T (Fig. 6) sur colonne échangeuse d'ions. Colonne polyanion SI HR 5/5 (Pharmacia Fine Chemicals) 5 x 50 mm. Solvant A : 0,001 M KH₂PO₄, pH 6. Solvant B : 1 M KH₂PO₄, pH 6, débit : 1 m1/mm ; température 20°C ; détecteur 254 nm, gradient : 2-40 % solvant B, 20 mn (Fig. 5) et gradient 2-50 % solvant B, 15 mn (Fig. 6).

L'ensemble des résultats montre que l'ion benzohydroxamate en milieu aprotique permet la désarylation d'oligonucléotides totalement protégés sans ruptures internucléotidiques importantes. Dans le cas de l'octanucléotide dT-T-A-T-C-A-G-G comportant les quatre nucléosides la déprotection des phosphates internucléotidiques par ce réactif conduit à d'aussi bons résultats qu'avec l'oxime. Il permet également le déblocage sélectif des groupes "arylphosphotriester" dans le cas des oligothymidylates 3'éthylphosphate.

Ce nouveau système de désarylation en milieu aprotique a été utilisé pour désaryler des oligothymidylates de type méthylphosphonate-arylphosphate, alkylphosphate-arylphosphate ainsi que des oligonucléotides modifiés comportant un groupe sensible à l'ion hydroxyle tel que la furocoumarine dont les synthèses seront décrites ailleurs.

<u>Remerciements</u> : Nous remercions vivement Mme V. ROIG pour l'aide technique importante qu'elle a apportée à la réalisation de ce travail.

Références et Notes

- 1. C.B. Reese, R.C. Titmas et L. Yau, Tetrahedron Letters 2727-2730 (1978).
- 2. C.B. Reese et L. Zard, Nucl. Acids Res. 9, 4611-4626 (1981).
- 3. P.S. Miller, N.D. Annan, K.B. McParland et S.M. Pulford, Biochemistry 21, 2507-2512 (1982).
- P.S. Miller, S.Chandrasegaran, D.L. Dow, S.M. Pulford et L.S. Kan, Biochemistry <u>21</u>, 5468-5474 (1982).
- 5. K.K. Ogilvie et S.L. Beaucage, Nucl. Acids Res. 7, 805-823 (1979).
- 6. R. Swidler et G.M. Steinberg, J. Amer. Chem. Soc., 78, 3594-3598 (1956).
- 7. A.L. Green, G.L. Sainsbury, B. Saville et M. Stansfield, J. Chem. Soc., 1583-1587 (1958).
- 8. H.J. Brass et M.L. Bender, J. Amer. Chem. Soc., <u>94</u>, 7421-7425 (1972).
- 9. Les composés (T-)_n Et sont utilisés comme témoins dans les études d'interactions des oligothymidylates substitués en 3' par un groupe intercalant avec les homopolynucléotides.
- 10. N.T. Thuong et M. Chassignol, Tetrahedron Letters, 21, 2063-2066 (1980).
- N.T. Thuong, M. Chassignol, G. Lancelot, R. Mayer, B. Hartmann, M. Leng et C. Hélène, Biochimie, <u>63</u>, 775-784 (1981).
- 12. I. Stawinski, T. Hozumi, S.A. Narang, C.P. Bahl et R. Wu, Nucl. Acids Res. 4, 353-371 (1977).
- 13. a- Chromatographie sur couche mince (CCM) : Merck D.C. Alufolien Kieselgel, 60 F 254, solvant : CH₂Cl₂, MeOH (9:1, v/v, système A) ; isoPrOH, H₂O, NEt₃ (80:15:5), système B.
 b- Après avoir fait migrer le p-chorophénol formé (Rf : 0,70 système A), les groupes aryl-phosphotriesters restants sont révélés *in situ* par la N-chloro dibromo-2,6 p-benzoquinone monoimine après hydrolyse alcaline.
- 14. Traitement par l'ammoniaque concentrée pendant 5 heures à 50°C pour éliminer les groupements protecteurs des bases et de l'hydroxyle en 3' puis déprotection de l'hydroxyle 5' par action de l'acide acétique à 80 %.
- 15. Après déprotection on élimine les réactifs ainsi que le phénol libéré en fixant les oligonucléotides sur une colonne de DEAE-cellulose puis en lavant avec une solution 10⁻³ M en NH₄HCO₃. Après lyophilisation, le mélange d'oligonucléotides est analysé par HPLC selon les conditions indiquées dans les légendes des figures 1, 2, 3, 4, 5 et 6.
- 16. Le chromatogramme représenté par la figure 4 a été obtenu par analyse en phase inverse du produit correspondant au pic principal du chromatogramme représenté par la figure 3.
- 17. Après purification par échange d'ions puis en phase inverse la déprotection totale a été vérifiée par détermination de la composition en nucléosides après dégradation enzymatique.
- 18. V.A. Efimov, S.V. Reverdatto et O.G. Chakhmakhcheva, Nucl. Acids Res. <u>10</u>, 6675-6694 (1982).
- 19. C.A. Leach, F. Waldmeier et C. Tamm, Helv. Chim. Acta 64, 2515-2523 (1981).

(Received in France 11 April 1984)