

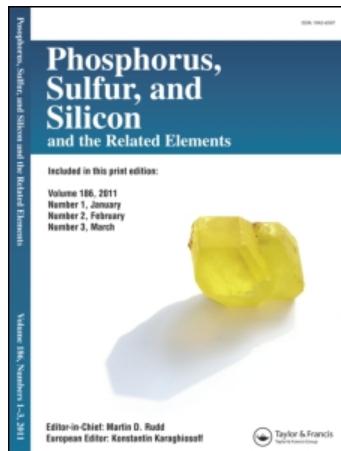
This article was downloaded by:

On: 30 January 2011

Access details: Access Details: Free Access

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713618290>

PHOSPHOAMMONIUM, REACTIF DE PHOSPHORYLATION EN SYNTHESE OLIGONUCLEOTIDIQUE

Nguyen Thanh Thuong^a; Christine Barbier Et^a; Ulysse Asseline^a

^a Centre de Biophysique Moléculaire 1A, avenue de la Recherche Scientifique, C.N.R.S., Orleans Cedex, France

To cite this Article Thuong, Nguyen Thanh , Et, Christine Barbier and Asseline, Ulysse(1983) 'PHOSPHOAMMONIUM, REACTIF DE PHOSPHORYLATION EN SYNTHESE OLIGONUCLEOTIDIQUE', Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 14: 3, 357 – 365

To link to this Article: DOI: 10.1080/03086648308073268

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/03086648308073268>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

PHOSPHOAMMONIUM, REACTIF DE PHOSPHORYLATION EN SYNTHESE OLIGONUCLEOTIDIQUE

NGUYEN THANH THUONG, CHRISTINE BARBIER et
ULYSSE ASSELINE

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

(Received September 24, 1982)

The methylarylhalogenophosphate-pyridine-1,5-dimethyltetrazole system permits the introduction of the arylphosphodiester group either in the 3' or in 5' position of a deoxynucleoside or of a nucleotide carrying sensitive protecting groups such as the dimethoxytrityl and β -cyanoethyl groups.

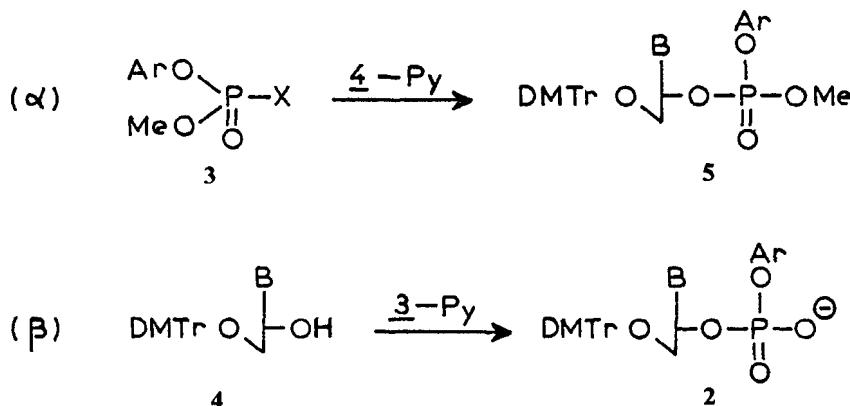
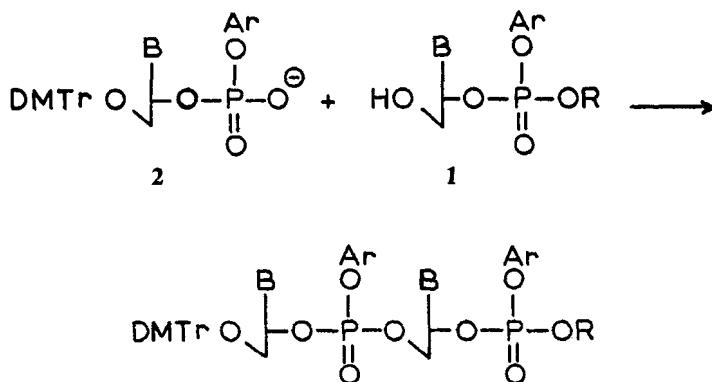
Le système méthylarylhalogénophosphate-pyridine-1,5-diméthyltétrazole permet d'introduire en une étape le groupe arylphosphodiester soit en 3' soit en 5' d'un désoxy nucléoside ou d'un nucléotide porteur de groupements protecteurs sensibles en milieu acide et basique.

INTRODUCTION

La méthode au phosphotriester modifié¹⁻⁵ connaît actuellement un développement considérable en synthèse d'oligodésoxy nucléotide (ODN); cette stratégie consiste à coupler l'hydroxyle-5' d'un nucléotide convenablement protégé **1** ($R = \beta$ -cyanoéthyle) avec un nucléoside-3' phosphodiester **2** (Schéma 1).

En vue de mettre au point de nouvelles synthèses simples de nucléoside-3' phosphodiesters **2** et de triesters de type **1** (avec $R = Me$, alkyle...), nous avons synthétisé et étudié les bromophosphates comme réactifs de phosphorylation;^{6,7} nous avons observé que le méthyl-p-chlorophénylbromophosphate **3a** réagit avec les désoxy nucléosides **4T**, **4A**, **4C** et **4G** pour donner essentiellement les nucléoside-3'-phosphotriesters **5Ta**, **5Aa**, **5Ca** et **5Ga** quand le bromophosphate est ajouté à une solution de nucléoside dans la pyridine (voie α). Par contre, lorsque les nucléosides **4T**, **4A**, **4C** et **4G** sont ajoutés à un mélange de bromophosphate **3a** et de pyridine (voie β), on n'obtient pas de triester mais des nucléoside-3'-phosphodiesters **2Aa**, **2Ca** et **2Ga** avec des rendements de 10 à 15% sauf dans le cas du diester **2Ta** (Schéma 2).

En vue d'élucider les mécanismes de ces réactions et d'accéder en une étape aux 4 désoxy nucléoside-phosphodiesters **2Ta**, **2Aa**, **2Ca** et **2Ga**, nous nous proposons d'étudier d'une part, la réaction entre les alkylarylhalogénophosphates **3** et la pyridine, et d'autre part de trouver de nouvelles conditions de phosphorylation plus efficaces que le système pyridinebromophosphate **3a**.



SCHEMA 2 (T) B = Thymine; (A) B = N-benzoyl-adénine; (C) B = N-anizoyl-cytosine; (G) B = N-isobutyryl-guanine; DMTr = p-dimethoxytrityle; Py = pyridine; (a) Ar = p-chlorophényle, X = Br.

RESULTATS

La réaction entre les alkylarylhalogénophosphates **3a** à **3e** avec la pyridine deutériée à 30°C a été suivie par RMN ¹H; les spectres ont été enregistrés siège que l'halogénophosphate a été ajouté à la solution de pyridine deutériée dans CDCl₃ puis en fonction du temps.

Pour les halogénophosphates utilisés (Tableau I), on observe la diminution ou la disparition du groupement ester ROP caractéristique de la réaction de déalkylation et l'apparition simultanée de l'halogénure alkyle et d'ion alkylpyridinium. La réaction de déalkylation est très rapide pour les alkylarylboromophosphates **3a** à **3d**, tandis qu'elle est beaucoup plus lente pour le chlorophosphate **3e**. De plus, la proportion respective d'halogénoalkyle et d'ion alkylpyridinium formés varie avec la nature de l'halogénophosphate.

Les essais de phosphorylation du 5'-O-diméthoxytritylthymidine **4T** par le méthyl p-chlorophénylbromophosphate **3a** en présence de bases tertiaires comme catalyseurs

TABLEAU I

Etude par RMN ^1H de la réaction de la pyridine deutérée avec les alkylarylhalogénophosphates 3

3

11

			Temps en mn	3 (%)	RX (%)	$\text{R}^{\oplus}\text{Py}, \text{X}^{\ominus}$ (%)
a	p-ClC ₆ H ₄	Me	Br	1 ^a	0	~ 15
				10	0	~ 85 100
b	O-ClC ₆ H ₄	Me	Br	1 ^a	0	~ 15
				10	0	~ 85 100
c	p-MeO ₂ CC ₆ H ₄	Me	Br	1 ^a	0	~ 15
				15	0	~ 85 100
d	p-ClC ₆ H ₄	Et	Br	1 ^a	0	~ 90
				10	0	~ 80
				15	0	~ 70
e	p-ClC ₆ H ₄	Me	Cl	1 ^a	~ 80	~ 7
				10	~ 23	~ 30
				30	0	33
						67

^aOn ajoute 6 mmol d'halogénophosphate (3a à 3e) à une solution de pyridine deutérée (0,5 ml) et de CDCl₃ (0,5 ml). Le spectre RMN ^1H (spectrographe Perkin-Elmer R12) est enregistré dès que le mélange est effectué. L'évolution du milieu réactionnel à 30°C a été déterminée en suivant d'une part le groupement ester ROP [(MeOP doublet (d) $\delta \sim 3,9-4$ ppm, $J = 14-15$ Hz), (CH₃—CH₂OP multiplet $\delta \sim 4,4$ ppm)] et d'autre part l'apparition d'halogénure alkyle et d'ion alkylpyridinium [(MeBr singulet (s) $\delta = 2,58$ ppm), (MeCl (s) $\delta = 3$ ppm), (MeCH₂Br, Me $\delta \sim 1,55$ ppm, CH₂ $\delta \sim 3,45$ ppm), (Me—NC₅D₅ (s) $\delta \sim 4,6$ ppm), (MeCH₂NC₅D₅, Me $\delta \sim 1,55$ ppm, CH₂ $\delta \sim 5,15$ ppm)].

nucléophiles ont été réalisés d'abord dans l'acétonitrile puis dans la pyridine, les proportions des composés formant le mélange réactionnel ont été estimées par chromatographie sur couche mince (CCM).

Dans l'acétonitrile (Tableau II), la phosphorylation du 5'-O-diméthoxytritylthymidine 4T par le méthyl p-chlorophénylbromophosphate 3a (selon la voie α) en présence de méthyl-1 imidazole (MI) ou de pyridine conduit essentiellement au triester 5Ta.

Dans les mêmes conditions, la triméthylamine (TMA) et la triéthylamine (TEA) donnent par contre, essentiellement le diester 2Ta à côté de faibles quantités de triester 5Ta; cette réaction de formation de diester 2Ta est beaucoup plus lente que celle du triester 5Ta et nécessite quelques heures à la température ambiante. Lorsque la réaction est réalisée selon la voie β et en présence de MI, seule une trace de composé ionique est formée et l'essentiel du nucléoside 4T est retrouvé intact.

Dans la pyridine (Tableau III), contrairement au bromophosphate 3a qui donne essentiellement les nucléoside-3' phosphotriesters 5Ta, 5Aa, 5Ca et 5Ga,⁷ la phosphorylation des quatre désoxynucléosides protégés 4T, 4A, 4C et 4G selon la voie α par le chlorophosphate 3e conduit, après 3 h à la température ambiante, seulement à des traces de triesters 5Aa, 5Ca et 5Ga et environ 30% de triester 5Ta. Par contre,

TABLEAU II

Phosphorylation du 5'-O-diméthoxytritylthymidine **4T** par le méthyl p-chlorophénylbromophosphate **3a** en présence de base R_3N et dans l'acétonitrile

4T		3a	5Ta	2Ta	
R_3N	Voie de Synthèse ^a	Durée à 20°C	4T (%)	5Ta (%)	2Ta (%)
MI	α	30 min	0	> 95	ϵ
	β	3 h	~ 100	0	ϵ
Py	α	30 min	0	~ 95	~ 5
TMA	α	3 h	0	ϵ	90-95
TEA	α	3 h	~ 10	~ 10	~ 75
DMTe ^b	α				

^a α : addition de **3a** (3 équivalents) à la solution de **4T** (1 équivalent) et de R_3N (8 équivalents) dans l'acétonitrile; β : addition de **4T** (1 équivalent) à la solution de **3a** (3 équivalents) et de MI (8 équivalents) dans l'acétonitrile.

^bOn observe que le 5'-OH est détritylé.

comme le bromophosphate **3a**, le chlorophosphate **3e** réagit avec les quatre nucléosides selon la voie β pour donner quantitativement le diester **2Ta** et environ 10% de diesters **2Aa**, **2Ca** et **2Ga**.

Lorsqu'on fait réagir le chlorophosphate **3e** avec les quatre nucléosides dans la pyridine et en présence de composés tels que le DMTe, la TMA, la p-diméthylaminopyridine (DMAPy) et le 1H-tétrazole (Te), on observe que le DMTe catalyse très nettement la réaction de formation des diesters **2Ta**, **2Aa**, **2Ca** et **2Ga**. La CCM du milieu réactionnel indique que ces derniers composés sont formés exclusivement après 3 h de réaction à la température ambiante lorsqu'on ajoute les nucléosides à un mélange de chlorophosphate **3e** et de DMTe dans la pyridine (voie β); les mêmes diesters sont aussi obtenus avec de bons rendements à côté de faibles quantités de triesters (20-30% de **5Ta** et ~ 2-4% de **5Aa**, **5Ca**, **5Ga**) quand le chlorophosphate est ajouté à une solution de nucléosides et de DMTe dans la pyridine.

Les quatre nucléoside-3' phosphodiesters **2Ta**, **2Aa**, **2Ca** et **2Ga** obtenus selon la voie β , après extraction au chloroforme, donnent une tache unique en CCM; ces composés ont été identifiés avec les mêmes produits préparés soit par décyanoéthylation des triesters β -cyanoéthyles,⁵ soit par déméthylation des triesters méthylés⁷ **5Ta**, **5Aa**, **5Ca** et **5Ga** correspondants.

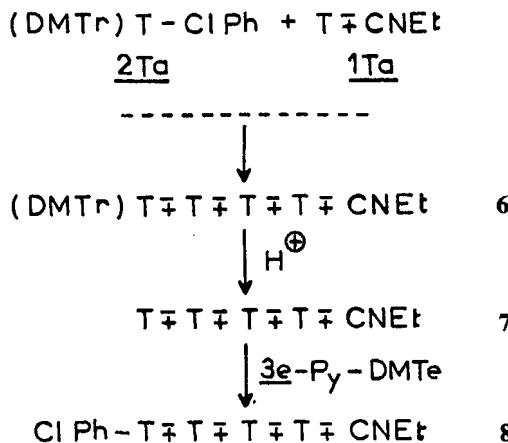
D'autre part, à partir du diester (DMTr)T-ClPh **2Ta** et du triester T \mp CNEt **1Ta**,⁵ le téranucléotide totalement protégé **6** a été synthétisé^{1,5} (Schéma 3). L'hydroxyle-5' du téranucléotide **7** obtenu par détritylation du composé **6** a été à son tour phosphorylé par le système chlorophosphate **3e**-pyridine-DMTe. La CCM du mélange réactionnel montre que la réaction est aussi complète après environ 1-2 h à la température ambiante. Le sel de pyridinium du téranucléotide pentaphosphate **8** a été isolé sous forme de solide blanc avec un bon rendement (90%).

TABLEAU III
Phosphorylation de l'hydroxyle-3' des désoxynucléosides protégés (ROH) **4^a** par les méthylarylhalogénophosphates
(MeO)(ArO)(O)P—X + ROH $\xrightarrow[\text{Py}]{\text{R}_3\text{N}}$ (RO)P(O)(OAr)(OMe) + (RO)P(O)(OAr)(O[⊖])

Ar	X	R ₃ N	Voie de Synthèse ^b	Durée à 20°C en h	Désoxynucléosides 4 (%)			Nucléoside-3' phosphodiesters 2 (%)			Nucléoside-3' phosphotriesters 5 (%)		
					3	4	5	A	C	G	A	C	G
a p-ClC ₆ H ₄	Br	Py ⁷	α	1	0	ε	ε	3-5	~5	~5	~97	~95	~95
				2	0	~100	~100	~100	~100	~100	ε	ε	0
e p-ClC ₆ H ₄	Cl	Py	α	3	0	~100	~100	~100	~70	ε	ε	~20-30	0
				2	0	~100	~100	~100	~100	~100	ε	ε	0
Cl	DMTe-Py	α	8	0	~90	~90	~90	~90	~10	~10	~10	0	0
				3	0	ε	ε	ε	~70	~97	~97	~30	~2-4
TMA-Py	β	1	0	10-20	10-20	10-20	10-20	100	~85	~85	~85	0	0
				3	~60	~60	~60	~70	~40	~40	~40	0	0
DMAPy-Py	β	3	β	3	~60	~60	~60	~70	~40	~40	~40	0	0
				3	90-95	90-95	90-95	~5-10	~5-10	~5-10	~5-10	0	0
f	2,4,5-Cl ₃ C ₆ H ₂	Cl	DMTe-Py	β	2	ε	ε	~100	~100	~100	~100	~100	~100

^a ROH **4**: (DMTr)T **4T**, (DMTr)dbzA **4A**, (DMTr)danC **4C**, DMTr dibG **4G**.

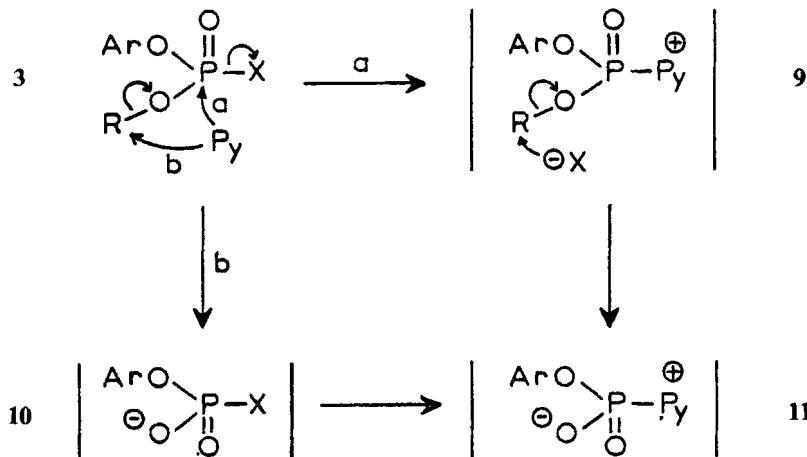
^b α: addition de méthylarylhalogénophosphate (**3a**, **3e**, **3f**) (3 équivalents) à la solution de nucléoside (**4T**, **4A**, **4C**, **4G**) (1 équivalent) et de R₃N (8 équivalents)²⁰ dans la pyridine; β: addition de nucléoside (**4T**, **4A**, **4C**, **4G**) (1 équivalent) à la solution de méthylarylhalogénophosphate (**3a**, **3e**, **3f**) (3 équivalents) et de R₃N (8 équivalents)²⁰ dans la pyridine.



SCHEME 3 Les abréviations sont suggérées par *IUPAC-IUB Biochemistry*, 9, 4022 (1970). La liaison phosphodiester est représentée par un trait et la liaison phosphotriester est représenté par le symbole (±). Chaque phosphate internucléotidique est protégé par le groupe p-chlorophényle CIPh; le phosphate-3' terminal est protégé par le groupe CIPh et CNET (β -cyanoéthyle).

DISCUSSION

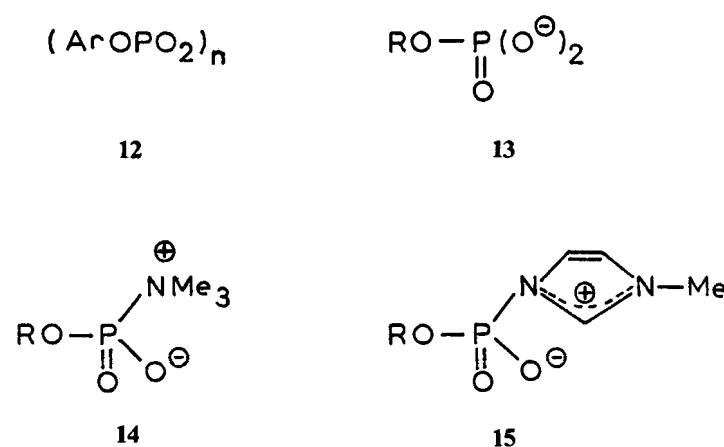
Dans la réaction de la pyridine avec les alkylarylhalogénophosphates **3a** à **3e**, la formation d'halogénure alkyle résulte du mécanisme *a* (Schéma 4), selon lequel la pyridine, dans une première étape, déplace l'halogénure qui déalkyle ensuite le phosphopyridinium **9**; par contre, la présence de l'ion alkylpyridinium pourrait résulter à la fois des mécanismes *a* ($\text{RX} + \text{pyridine}$) et *b* (déalkylation de **3** par la pyridine) (mécanisme SN_2C).



SCHEMA 4

Dans le cas des méthylarylboromophosphates **3a**, **3b** et **3c**, la faible proportion de bromure de méthyle observée par rapport à celle du méthylpyridinium ne permet pas de préciser l'importance relative de ces deux mécanismes. En effet le spectre de RMN ¹H enregistré siège le bromure de méthyle ajouté à la pyridine dans les mêmes conditions que précédemment, montre la transformation instantanée du singulet correspondant à CH₃Br (δ = 2,5 ppm) en un singulet (δ = 4,6 ppm) correspondant à l'ion méthylpyridinium. Lorsque l'halogénure libéré (MeCl pour **3e** et EtBr pour **3d**) est moins réactif que le bromure de méthyle, sa proportion observée à un instant donné, devient importante (**3e**) et largement prédominante quand la déalkylation de l'halogénophosphate est très rapide (**3d**). Ces résultats suggèrent que le mécanisme *a* serait prédominant sinon presque exclusif pour les bromophosphates.

La pyridine extrêmement utilisée en synthèse nucléotidique comme milieu réactionnel et accepteur d'acide, intervient donc profondément sur le cours de ces réactions de phosphorylation. La très grande labilité de la liaison P—Br de **3a** permet donc d'obtenir les nucléoside-3' phosphotriesters **5Ta**, **5Aa**, **5Ca** et **5Ga** selon la voie *α*, l'agent phosphorylant serait ici le bromophosphate **3a** ou le complexe phosphopyridinium **9**; le chlorophosphate **3e** beaucoup moins réactif que son analogue **3a** est en grande partie désactivé par déméthylation avant de réagir avec l'hydroxyle-3' des nucléosides **4T**, **4A**, **4C** et **4G**. Avec le nucléoside **4T**, la formation presque exclusive et avec la même vitesse (~ 2 h) du diester **2Ta**, à partir du bromophosphate **3a** et du chlorophosphate **3e** selon la voie *β*, passe vraisemblablement par l'intermédiaire ionique du type phosphopyridinium **11**, quelle que soit la nature de la liaison P—X de départ. La structure phosphopyridinium **11** ainsi que le métaphosphate **12** (monomère ou trimère) ont été déjà proposés comme intermédiaires possibles formés lors de la réaction de couplage d'un monoester **13** avec un alcool dans la pyridine et en présence d'agents de condensation tels que le di-cyclohexylcarbodiimide⁸⁻¹⁰ ou un arylsulfonylchlorure.¹¹ Le complexe phosphopyridinium de type **11** n'a pas été isolé à notre connaissance, cependant, certains phosphoammoniums analogues **14**¹² et **15**¹³ ont pu être isolés et étudiés (Schéma 5). De plus, le manque de réactivité du mélange pyridine-halogénophosphate (**3a** ou **3e**)



SCHEMA 5

vis-à-vis des nucléosides **4A**, **4C** et **4G** est un argument en faveur de l'intermédiaire du type ionique **11** plutôt que du métaphosphate très réactif.

Dans la pyridine et en présence de DMTe, la phosphorylation des quatre désoxynucléosides par le chlorophosphate **3e** conduit aux nucléosides-3' phosphodiesters **2Ta**, **2Aa**, **2Ca** et **2Ta** quelle que soit la voie de synthèse utilisée (α ou β) (sauf pour le nucléoside **4T** selon la voie α). L'effet catalytique du DMAPy^{14,15} et de la TMA¹⁶ déjà signalé dans les réactions d'acylation, est retrouvé ici, par contre le tétrazole,^{1,3,17} très utilisé pour activer les réactions de couplage de nucléotides, est inefficace.

Le système chlorophosphate-pyridine-DMTe permet en outre d'introduire en une seule étape un groupe arylphosphodiester en 5' d'un ODN protégé.

Les résultats de cette étude montrent que le système chlorophosphate **3e**-pyridine-DMTe est un système monofonctionnel particulièrement efficace pour introduire un groupe arylphosphodiester soit en 3', soit en 5' d'un nucléoside ou d'un nucléotide. De plus, cette réaction de phosphorylation peut être réalisée en présence de groupements protecteurs sensibles en milieu acide et basique tels que les groupes diméthoxytrityle et β -cyanoéthyle.

*Essais de Phosphorylation des Nucléosides **4T**, **4A**, **4C** et **4G** par les Halogénophosphates Selon la Voie α*

On ajoute sous agitation et à -20°C une solution benzénique (0,3 ml) d'halogénophosphate (**3a**, **3e**) (1 mmol) à une solution de nucléoside (**4T**, **4A**, **4C**, **4G**) (0,33 mmol) et de "base" (MI, Py, TMA, TEA, DMTe) (3 mmol)¹⁸ dans le solvant (acétonitrile ou pyridine) (2 ml); on laisse le mélange réactionnel revenir à la température ambiante puis suit l'évolution de la réaction par CCM (Tableaux II et III).

*Phosphorylation des Nucléosides **4T**, **4A**, **4C** et **4G** par les Halogénophosphates Selon la Voie β*

La solution benzénique (0,3 ml) d'halogénophosphate (**3a**, **3e**, **3g**) (1 mmol) est ajoutée sous agitation à -20°C à une solution de "base" (DMTe, TMA, DMAPy, Te) (3 mmol)¹⁸ dans la pyridine (3 ml). L'addition terminée, on continue l'agitation 30 mn à la température ambiante puis ajoute à 0°C une solution de nucléoside (**4T**, **4A**, **4C**, **4G**) (0,33 mmol) dans la pyridine (0,5 ml). On laisse le mélange réactionnel revenir à la température ambiante puis suit l'évolution de la réaction par CCM (Tableaux II et III).

REFERENCES ET NOTES

1. J. Stawinski, R. Hozumi, S. A. Narang, C. P. Bahl et R. Wu, *Nucleic Acids Res.*, **4**, 353 (1977).
2. D. Molko, R. B. Derbyshire, A. Guy, A. Roget et R. Teoule, *Tetrahedron Letters* 2159 (1980).
3. W. L. Sung, H. M. Hsiung, R. Brousseau, J. Michniewicz, R. Wu et S. A. Narang, *Nucleic Acids Res.*, **7**, 2199 (1979).
4. P. S. Miller, D. M. Cheng, N. Dreon, K. Jayaraman, L. J. Kan, E. E. Leutzinger, S. M. Pulford et P.O.P. Ts'o, *Biochemistry* **19**, 4688 (1980).
5. N. T. Thuong, M. Chassignol, G. Lancelot, R. Mayer, B. Hartmann, M. Leng et C. Hélène, *Biochimie*, **63**, 775 (1981).

6. N. T. Thuong et M. Chassignol, *Tetrahedron Letters*, 2063 (1980).
7. C. Barbier, U. Asseline, M. Chassignol et N. T. Thuong, à soumettre au *Bull. Soc. Chim.*
8. G. Weimann et H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4329 (1962).
9. A. R. Todd, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **45**, 1389 (1959).
10. F. Cramer et H. H. Ettler, *Chem. Ber.* **91**, 1181 (1958).
11. D. G. Knorre, V. F. Zarytova, A. W. Lebedev, L. M. Khalimskaya et E. A. Sheshegova, *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1253 (1978).
12. H. Zamarlik, N. T. Thuong et P. Chabrier, *C. R. Acad. Sci.*, **278C**, 1385 (1974).
13. P. E. Chabrier, N. H. Phuong, N. T. Thuong et P. Chabrier, *C. R. Acad. Sci.*, **288C**, 379 (1979).
14. E. Guibé-Jampel et M. Wakselman, *Chem. Comm.*, **267** (1971).
15. W. Steglich et G. Höfle, *Tetrahedron Letters*, 4727 (1970).
16. N. T. Thuong, M. Chassignol, U. Asseline et P. Chabrier, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **II**, 51 (1981).
17. A. K. Seth et E. Jay, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5445 (1980).
18. La "Base" est supprimée lorsque la réaction est réalisée dans la pyridine seule.