

This article was downloaded by:

On: 27 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



Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597286>

Sur l'Obtention d'Oligonucleotides en Serie Ara-A

J. L. Barascut^a; H. B. Lazrek^a; J. L. Imbach^a

^a Laboratoire de Chimie Bio-Organique, U.S.T.L. E.R.A. 948 du C.N.R.S., Montpellier, Cédex, France

To cite this Article Barascut, J. L. , Lazrek, H. B. and Imbach, J. L.(1984) 'Sur l'Obtention d'Oligonucleotides en Serie Ara-A', *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 3: 4, 423 — 439

To link to this Article: DOI: 10.1080/07328318408081280

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/07328318408081280>

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.

SUR L'OBTENTION D'OLIGONUCLEOTIDES EN SERIE ARA-A

J.L. Barascut, H.B. Lazrek, J.L. Imbach*,

Laboratoire de Chimie Bio-Organique, U.S.T.L.

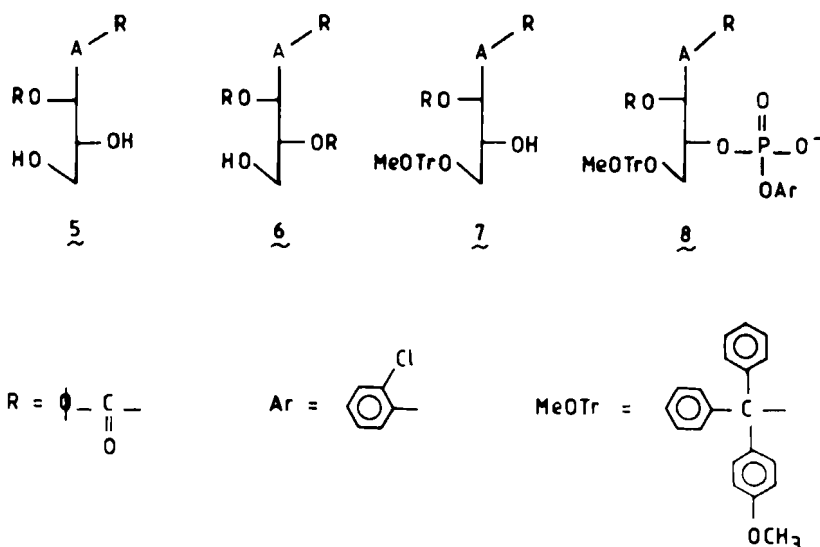
E.R.A. 948 du C.N.R.S.

Place Eugène Bataillon, 34060 Montpellier Cédex, France

ABSTRACT : The synthesis of dimer, trimer and tetramer of Ara-A was described by phosphotriester approach in solution. All of these compounds and building blocks are identified and described unambiguously.

Le but de ce travail a été de synthétiser de courts fragments d'oligonucléotides de l'Ara-A 1 (1), ceci avec un objectif à la fois théorique et pratique. En effet, nous désirions savoir si la présence de l'hydroxyle en 2' (cis par rapport à l'OH en 5') n'entraînerait pas de modifications de réactivité lors des couplages oligonucléotidiques. De plus, nous étions intéressés par une étude physicochimique ayant pour but de comparer l'empilement de divers oligonucléotides en fonction de la nature de l'ose et ceci par RMN à haut champ. Pour ce faire, nous avons synthétisé le tétramère 2 ainsi que les trimère 3 et dimère 4 correspondants, afin de nous aider à attribuer l'ensemble des signaux observés par RMN (2). Cependant, durant l'élaboration de ce travail (1) la synthèse d'un trimère identique à 3 a été décrite mais en utilisant une stratégie légèrement différente de celle que nous allons exposer.

Pour parvenir à ces différents composés et compte tenu du programme envisagé, nous avons utilisé comme approche de synthèse, la



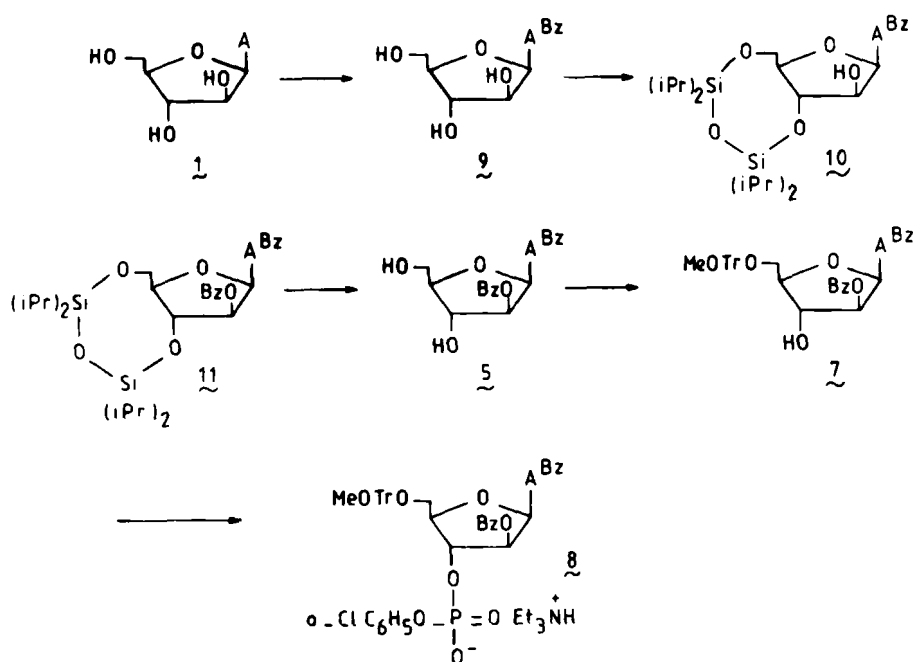
_ Figure 1 _

méthode aux phosphotriesters en solution. Celle-ci permet en effet d'envisager l'obtention d'oligonucléotides en quantité plus importante que la synthèse en phase solide. D'autre part, dans un but de simplification par rapport à la littérature (1), nous avons envisagé de créer la liaison 3'→5' en condensant les phosphodiester avec des synthons non protégés sur l'hydroxyle en 3' en espérant que la plus grande réactivité de la fonction alcool primaire conduirait à l'obtention préférentielle de la liaison 3'→5'.

La stratégie ainsi définie implique de déterminer *a priori* la nature des synthons à utiliser. Tout d'abord, nous avons choisi le groupement ortho-chlorophényl pour la protection du phosphate, étant donné la plus grande réactivité de l'ortho-chlorophénylphosphorodichloridate et la facilité d'élimination du groupement aryle lors de la déprotection finale (3).

Par contre, au niveau des protections des hydroxyles en 5', 3' ou 2' nous avons utilisé les groupements usuels (MeOTr, Bz) alors que des protections légèrement différentes (pixyl, acétyl, silyl) ont été choisies dans l'exemple déjà cité (1).

Dans ces conditions, la première étape de ce travail a donc consisté à synthétiser les synthons représentés sur la Figure 1, objectif préalable à toute synthèse oligonucléotidique.

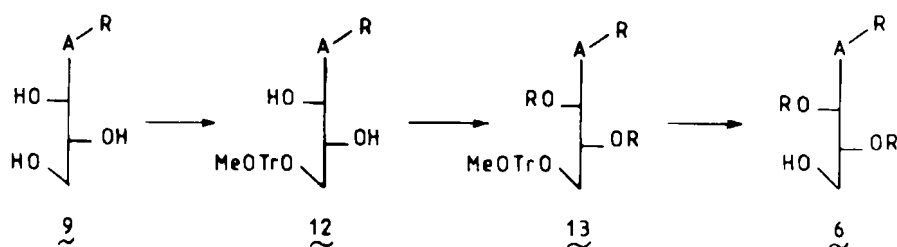


_ Figure 2 _

I - SYNTHÈSE DES SYNTHONS DE DÉPART

Le produit de départ pour une telle synthèse est le tétraisopropyl-3',5'-dibenzoyl-2',N⁶-β-D-arabinofuranosyl-9 adénine **11** obtenu avec un rendement global de 70 % à partir de l'Ara-A **1**, par les méthodes classiques de la littérature (4-9) (FIG. 2).

Grâce au TiPDSiCl_2 , nous avons à ce stade introduit une différenciation entre les hydroxyles en 2' et 3'. Pour parvenir au synthon **7**, ce groupement est ensuite éliminé quantitativement par le fluorure de tétra-n-butylammonium (TBAF) (10). La monométhoxytritylation sélective de l'hydroxyle primaire de **5** nous conduit ensuite au monométhoxytrityl-5'-dibenzoyl-2',N⁶-β-D-arabinofuranosyl-9 adénine **7** avec un rendement de 84 % (FIG. 2). Le phosphodiester **8** est alors isolé sous forme de son sel de triéthylammonium avec un rendement de 95 % après extraction au chloroforme et précipitation dans l'éther de pétrole.



- Figure 3 -

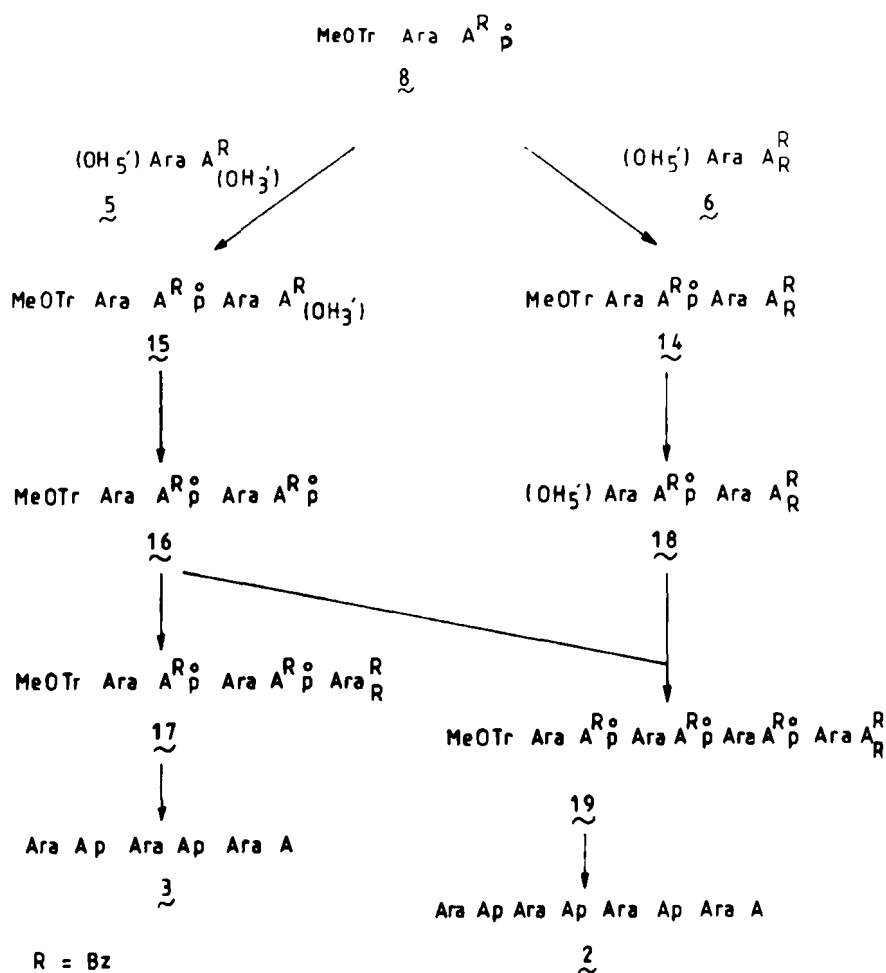
Le nucléoside 9 constitue le point de départ pour la synthèse du synthon 6 nécessaire pour l'obtention du tétramère 19, celui-ci étant obtenu par les méthodes classiques avec un rendement global de 60 % (FIG. 3).

Le groupement *o*-chlorophénylphosphate est introduit en 3' de 7 par action d'un excès d'*o*-chlorophénylphosphorodi-(triazol-1,2,4-ide-) suivie d'une hydrolyse par $\text{Et}_3\text{N}-\text{H}_2\text{O}$ suivant un protocole déjà décrit (1).

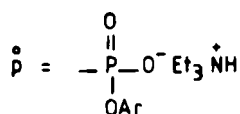
II - SYNTHÈSE DES OLIGONUCLÉOTIDES (FIG. 4)

La condensation du phosphodiester 8 et du nucléoside 5 dont les hydroxyles en 3' et 5' sont libres dans la pyridine en présence de MSNT en excès, nous conduit après 45 mn d'agitation à température ambiante à l'obtention de deux produits. Leur caractérisation a été effectuée, après déprotection des différentes fonctions, par comparaison de leurs temps de rétention en chromatographie liquide haute performance avec ceux des dinucléosides monophosphates synthétisés de manière univoque. Ainsi, le dimère symétrique (3'→3') est obtenu par condensation de 8 et de 7 en présence de MSNT et le dimère (3'→5') 14 par condensation de 8 et de 6 (FIG. 4). Par conséquent, la synthèse que nous venons d'effectuer nous conduit à l'obtention de 75 % du dinucléoside monophosphate (3'→5') 15 et 5 % du dimère (3'→3').

Ces résultats indiquent que cette réaction est suffisamment sélective pour ne pas nécessiter la protection de la position 3' du nucléoside entrant 5 dans la mesure où il est possible de les séparer facilement par chromatographie sur colonne.



R = Bz



Ar = o - Cl Ph

- Figure 4 -

Le phosphodiester 16 est ensuite obtenu par action de l'o-chlorophénylphosphodi-(triazol-1,2,4 ide) sur le dinucléoside monophosphate 15, puis condensé en présence de MSNT avec le nucléoside 6 pour conduire ainsi au trimère totalement protégé 17. Le tétramère 19, quant à lui, est aisément obtenu par condensation des deux blocs 16 et 18, dans des conditions semblables à celles que nous venons d'exposer. La déprotection des fonctions organiques des oligonucléotides obtenus (15, 17, 19) a été effectuée de la manière usuelle.

TABLEAU I

		R_T	ϵ	S	$\frac{S}{\epsilon \cdot n}$
					$\sum S/\epsilon$
<u>2</u>	Ara A	7,41	13 400	535	1,20
	pAra A	4,16	13 400	1241	2,80
<u>3</u>	Ara A	7,51	13 400	366	1,27
	pAra A	4,29	13 400	498	1,80
<u>4</u>	Ara A	7,61	13 400	1731	1,10
	pAra A	4,29	13 400	1407	0,90

R_T = temps de rétention en mn.

n = nombre de (nucléoside + nucléotide).

S = surface du pic.

Les dérivés oligonucléotidiques 2, 3 et 4 sont ensuite purifiés par chromatographie sur colonne de DEAE Sephadex A_{25} avec un gradient linéaire de $10^{-3}M$ et $1M$ d'hydrogencarbonate de triéthylammonium à $pH = 7,5$. Chacun d'eux est obtenu avec une pureté optique de 99,9 % et un rendement compris entre 93 et 95 % après lyophilisation. Leur caractérisation a été effectuée par digestion enzymatique par la phosphodiesterase de venin de serpent (*Crotalus Durissus Terrificus*). L'analyse des produits résultants de la digestion enzymatique a été effectuée après 36 h à $37^\circ C$ par chromatographie liquide haute performance sur colonne C_{18} en phase inverse, en utilisant un gradient de 2 à 12 % en acétonitrile. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau I et nous confirment la structure de chacun des composés.

CONCLUSION

Nous avons effectué dans ce travail la synthèse de quelques oligonucléotides de l'Ara-A par la méthode aux phosphotriesters en phase liquide et selon une approche légèrement différente de celle utilisée par CHATTOPADHYAYA (1) qui ne décrit que le trimère correspondant.

Nous avons donc été amenés tout d'abord à préparer les synthons de départ convenablement substitués dont les groupements protecteurs ont été choisis de façon à être compatibles avec l'approche utilisée. Les caractéristiques physico-chimiques de tous ces dérivés sont en accord avec les structures proposées. Celles des oligonucléotides déprotégés, 2, 3 et 4, ont été notamment confirmées par RMN à haut champ (2) et par spectrométrie de masse par la méthode d'ionisation MBSA-FAB (14). Les synthèses oligonucléotidiques effectuées indiquent que les dérivés de l'arabinose présentent un comportement analogue à celui des désoxy-2' nucléosides lors des étapes de condensation. L'ensemble de ce travail montre bien que les dérivés de l'arabinose peuvent être incorporés dans des chaînes oligonucléotides mixtes ou conduire à des oligoarabinonucléotides de structure homogène.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les solvants doivent être purs et anhydres. La pyridine est distillée sur chlorure de p-toluène sulfonyle puis sur CaH_2 et conservée sur tamis moléculaire 4 A.

Les chromatographies sur couche mince sont faites sur plaque de silice "Merck Kieselgel 60F 254". Les taches sont révélées à la lampe U.V. et par pulvérisation d'acide sulfurique à 10 % suivie d'un chauffage de la plaque à 150°C. Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sous faible pression avec du gel de silice 60H Merck.

Les analyses élémentaires ont été effectuées par le service de Microanalyse du C.N.R.S., Division de Vernaison.

Les points de fusion non corrigés sont pris en capillaire sur un appareil Buchi.

Les spectres U.V. ont été enregistrés au moyen d'un spectromètre Optica Modèle 10. Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ont été pris sur des appareils Varian 60 et EM 390. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS comme référence interne. La multiplicité des signaux observés est indiquée par une lettre minuscule : s = singulet ; d = doublet ; t = triplet ; q = quartet ; m = multiplet.

L'analyse HPLC des oligonucléotides synthétisés ainsi que celle du résultat de leur digestion enzymatique a été effectuée à l'aide d'un appareil Waters équipé d'un détecteur à 254 nm., d'un programmeur de gradient, d'un module à compression radiale RCM-100 et d'une colonne analytique de μ Bondapack C₁₈. Le gradient d'élution est formé à partir d'une solution A (2 % d'acétonitrile) et d'une solution B (12 % d'acétonitrile), chacune préparée dans une solution aqueuse à 1 % d'acétate d'ammonium à pH = 5,9 (13). Pour un débit de 3 ml/mn, on élue selon un gradient linéaire à partir de 2 % d'acétonitrile (A pur) à 12 % en 15 mn. Les temps de rétention sont donnés par rapport à l'injection.

La phosphodiesterase de venin de *Crotalus Durissus Terrificus* (1 mg dans 1 ml d'une solution à 50 % de glycérol) a été fournie par Boehringer Mannheim (RFA).

Benzoyl-N⁶ β -D-Arabinofuranosyl-9 adénine 9.

A une suspension de 1 g (3,74 mmol.) d'Ara-Adénine 1 dans 30 ml de pyridine anhydre, on additionne 18 ml (150 mmol.) de chlorure de benzoyle goutte à goutte en refroidissant. Après 36 heures d'agitation à température ambiante, 100 ml d'eau glacée sont ajoutés. Le mélange réactionnel est extrait au chloroforme (4x60 ml). La phase organique est lavée à l'hydrogénocarbonate de sodium, filtrée, évaporée, ensuite coévaporée au toluène (2x50 ml). Après purification sur colonne de gel de silice (éluant CHCl₃), les nucléosides obtenus sont dissous dans 25 ml de pyridine. Cette solution est additionnée à 40 ml de NaOH 2N, puis agitée durant 20 mn, 80 ml de résine Dowex 50-X₂(pyridinium)(pH = 6-7) sont ensuite ajoutés. La résine

est filtrée, lavée avec (3x50 ml) d'eau. La phase aqueuse est extraite à l'éther (6x100 ml), concentrée, le précipité formé est filtré, puis cristallisé dans l'eau. Le composé 9 est obtenu avec un rendement de 85 %. Rf : 0,26 (éluant $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$, 80/20, v/v). F : 145–147°C (eau). Analyse calc. pour: $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_5$, Calc. C : 55,02 H : 4,56 N : 18,74 Tr. C : 54,98 H : 4,58 N : 18,86. U.V. λ_{max} (eau) : 281 nm. ($\epsilon = 20.800$). RMN : $\text{DMSO}-d_6/\text{TMS}$: 8,70 ($\text{H}_2, s, 1\text{H}$) 8,56 ($\text{H}_8, s, 1\text{H}$) 8,23–7,36 (H -aromatiques, m, 5H) 6,40 ($\text{H}_1, d, J_{1,2} = 4,8 \text{ Hz}, 1\text{H}$) 5,70 ($\text{OH}_2, \text{OH}_3, m, 2\text{H}$) 5,13 ($\text{OH}_5, m, 1\text{H}$) 4,26 ($\text{H}_2, 3, m, 2\text{H}$) 3,70 ($\text{H}_4, 5, 5', m, 3\text{H}$).

TiPDSi-3',5' Benzoyl- N^6 β -D-arabinofuranosyl-9 adenine 10.

A 1,98 g (6,71 mmol.) de TiPDSiCl_2 , on ajoute 1,34 g (19,66 mmol.) d'imidazole, 1,66 g (4,47 mmol.) du composé 9, 50 ml de DMF anhydre. Après une heure d'agitation à température ambiante, 50 ml d'eau sont ajoutés, le mélange est évaporé sous pression réduite. Le résidu est redissous dans 100 ml d'eau puis extrait au chloroforme (3x80 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, évaporée à sec. Après purification sur colonne de gel de silice (éluant $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$, 50/50, v/v), le composé 10 est obtenu sous forme d'une mousse blanche avec un rendement de 80 %. Rf = 0,36 (éluant : acétate d'éthyle). Analyse calc. pour : $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_6\text{Si}_2$; Calc. C : 55,59 H : 7,02 N : 11,18. Tr. C : 55,70 H : 6,92 N : 11,32. U.V. : λ_{max} (Ethanol 95) : 279 nm. ($\epsilon = 22.400$) 232 nm. ($\epsilon = 19.100$). RMN : $\text{CDCl}_3/\text{TMS}/\text{D}_2\text{O}$: 8,38 ($\text{H}_2, s, 1\text{H}$) 8,11 ($\text{H}_8, s, 1\text{H}$) 8,0–7,3 (H -aromatiques, m, 5H) 6,20 ($\text{H}_1, d, J_{1,2} = 5,1 \text{ Hz}$) 4,60 ($\text{H}_2, 3, m, 2\text{H}$) 4,0 ($\text{H}_4, 5, 5', m, 3\text{H}$) 1,1 (isopropyle, m, 28H).

TiPDSi-3'5' dibenzoyl-2', N^6 β -D-arabinofuranosyl-9 adénine 11.

Une solution contenant 2,1 g (3,42 mmol.) du composé 10, 0,851 g (3,76 mmol.) d'anhydride benzoïque, 0,138 g (1,14 mmol.) de diméthyl amino-4 pyridine dans 15 ml de pyridine anhydre, est agitée 3 heures à température ambiante. Après évaporation sous pression réduite, le résidu est dissous dans 100 ml de chloroforme, la solution résultante est lavée successivement avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium et avec de l'eau (2x100 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium,

filtrée, évaporée sous pression réduite. Après purification sur colonne de gel de silice (éluant : CHCl_3 /hexane, 70/30, v/v), le composé 11 est obtenu sous forme d'une mousse blanche avec un rendement de 95 %. $R_f = 0,37$ (éluant CHCl_3 /AcOEt, 70/30, v/v). Analyse calc. pour : $\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_7\text{Si}_2$: Calc. C : 60,25 H : 6,55 N : 9,76 Tr. C : 60,01 H : 6,60 N : 9,40. U.V. : λ_{max} (Ethanol 95) : 279 nm. ($\epsilon = 22.400$) 232 nm. ($\epsilon = 24.300$). RMN : CDCl_3 /TMS : 8,66 (H_2 , s, 1H) 8,16 (H_8 , s, 1H) 8,1-7,1 (H-aromatiques, m, 10H) 6,63 (H_1 , d, $J_{1,2} = 6\text{Hz}$, 1H) 5,83 (H_2 , dd, $J_{2,3} = 8\text{Hz}$, 1H) 5,43 (H_3 , t, $J_{3,4} = 8\text{Hz}$, 1H) 4,20 ($\text{H}_{4,5,5''}$, m, 3H) 1,1 (isopropyle, m, 28H).

Di-benzoyl-2', N⁶β-D-arabinofuranosyl-9 adénine 5.

On dissout 100 mg (0,139 mmol.) du composé 11 dans 6 ml d'une solution (0,5M) de fluorure de tétrabutylammonium dans le tétrahydrofurane ; après 45 mn d'agitation à température ambiante, la solution est évaporée sous pression réduite. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant CHCl_3 /MeOH, 99/1, 98/2, v/v). Le composé 5 est obtenu avec un rendement de 75 % après précipitation dans le chloroforme. $F = 124-126^\circ\text{C}$ (CHCl_3). $R_f = 0,27$ (éluant CHCl_3 /MeOH, 90/10, v/v). Analyse calc. pour : $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_6$: Calc. C : 60,63 H : 4,42 N : 14,73. Tr. C : 60,84 H : 4,41 N : 14,76. U.V. : λ_{max} (Ethanol 95) : 280 nm. ($\epsilon = 17.250$) 231nm. ($\epsilon = 20.700$). RMN : $\text{DMSO}-d_6$ /TMS : 8,76 (H_2 , s, 1H) 8,60 (H_8 , s, 1H) 8,14-7,24 (H-aromatiques, m, 10H) 6,74 (H_1 , d, $J_{1,2} = 6\text{Hz}$, 1H) 5,72 (H_2 , t, $J_{2,3} = 6\text{Hz}$, 1H) 4,66 (H_3 , m, 1H) 4,02 (H_4 , m, 1H) 3,82 ($\text{H}_{5,5''}$, m, 2H).

Monométhoxytrityl-5' di-benzoyl-2', N⁶β-D-arabinofuranosyl-9 adénine 7.

Une solution contenant 0,900 g (1,89 mmol.) du composé 5 et 1,10 g (3,78 mmol.) de chlorure de monométhoxytrityle dans 20 ml de pyridine anhydre est agitée durant 22 heures à température ambiante à l'abri de l'humidité et de la lumière. Après addition de 150 ml d'eau glacée, le mélange réactionnel est extrait avec du chloroforme (3x70 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée, évaporée à sec, puis coévaporée au toluène (2x30 ml). Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : CHCl_3 /Et₃N 100/0,1, v/v). Le produit 7 est obtenu avec un rendement de 84 % après précipitation dans l'éther de pétrole. $R_f =$

0,20 (éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 98/2, v/v). Analyse calc. pour : $\text{C}_{44}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_7$: Calc. C : 70,68 H : 4,95 N : 9,37. Tr. C : 71,03 H : 4,99 N : 9,60. U.V. : λ_{max} (Ethanol 95) : 279 nm. ($\epsilon = 22.500$) 231 nm. ($\epsilon = 28.000$). RMN : CDCl_3/TMS : 8,66 (H_2 , s, 1H) 8,32 (H_8 , s, 1H) 8,1-7,0 (H-aromatiques, m, 22H) 6,75 (H-aromatiques, 2H) 6,70 (H_1 , d, $J_{1,2} = 5\text{Hz}$, 1H) 5,57 (H_2 , t, $J_{2,3} = 5\text{Hz}$, 1H) 4,76 (H_3 , OH₃, m, 2H) 4,38 (H_4 , m, 1H) 3,70 (OCH_3 , s, 3H) 3,52 (H_5 , s, m, 2H).

Monométhoxytrityl-5' benzoyl- H^6 β -D-arabinofuranosyl-9 adénine 12.

Une solution contenant 400 mg (1,08 mmol.) du composé 9 et 650 mg (2,16 mmol.) de chlorure de monométhoxytrityle dans 7 ml de pyridine anhydre est agitée à température ambiante durant 22 heures à l'abri de l'humidité et de la lumière. Après addition de 25 ml d'eau glacée, le mélange réactionnel est extrait au chloroforme (3x15 ml), la phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée, évaporée puis coévaporée au toluène (2x10 ml). Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$, 98/1/1, v/v/v). Le composé 12 est obtenu avec un rendement de 70 %. Rf = 0,34 (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 90/10, v/v). Analyse calc. pour : $\text{C}_{37}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_6$: Calc. C : 68,70 H : 5,35 N : 11,01. Tr. C : 69,05 H : 5,28 N : 10,88. U.V. : λ_{max} (Ethanol 95) : 280 nm. ($\epsilon = 13.900$) 231 nm. ($\epsilon = 18.200$). RMN : CDCl_3/TMS : 8,50 (H_2 , s, 1H) 8,33 (H_8 , s, 1H) 8,16-6,96 (H-aromatiques, m, 17H) 6,70 (H-aromatiques, d, 2H) 6,43 (H_1 , d, $J_{1,2} = 4\text{Hz}$, 1H) 4,40 (H_2 , s, m, 2H) 4,10 (H_4 , m, 1H) 3,70 (OCH_3 , s, 3H) 3,43 (H_5 , s, m, 2H).

Monométhoxytrityl-5' tribenzoyl-2'3', H^6 β -D-arabinofuranosyl-9 adénine 13.

Une solution contenant 200 mg (0,31 mmol.) du composé 12, 146 mg (0,69 mmol.) d'anhydride benzoïque, 13 mg (0,10 mmol.) de diméthylamino-4 pyridine dans 2 ml de pyridine anhydre est agitée à température ambiante durant 1 h 15. Après addition de 30 ml d'hydrogénocarbonate de sodium aqueux, la solution est extraite au chloroforme (3x15 ml), séchée sur sulfate de sodium, filtrée, évaporée, coévaporée au toluène (2x10 ml). Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (éluant $\text{CHCl}_3/\text{hexane}/\text{Et}_3\text{N}$, 80/19/1, v/v/v). Le composé 13 est obtenu avec un rendement de 90 % après précipitation dans l'hexane. Rf = 0,25 (éluant $\text{CHCl}_3/\text{éther}$, 90/10, v/v).

Analyse calc. pour : $C_{51}H_{42}N_5O_8$: Calc. C : 71,80 H : 4,93 N : 8,04 : Tr. C : 71,91 H : 4,93 N : 8,22. RMN : $CDCl_3/TMS$: 8,76 (H_2 , s, 1H) 8,30 (H_8 , s, 1H) 8,30-7,10 (H-aromatiques, m, 27H) 6,83 ($H_{1,2}$, d, $J_{1,2} = 4\text{Hz}$, 1H) 6,70 (H-aromatiques, d, 2H) 6,03 ($H_{2,3}$, m, 2H) 4,50 (H_4 , m, 1H) 3,73 (OCH_3 , s, 1H) 3,63 ($H_{5,5''}$, m, 2H).

Tribenzoyl-2', 3', N⁶ β -D-arabinofuranosyl-9 adénine 6.

On dissout 200 mg (0,24 mmol.) du composé 13 dans 9 ml d'un mélange chloroforme-méthanol (7/3, v/v) contenant 2 % d'acide benzène sulfonique, la réaction est agitée pendant 20 mn à 0°C. 10 ml d'hydrogénocarbonate de sodium aqueux, sont additionnés, le mélange est extrait au chloroforme (3x8 ml). La phase organique est lavée avec 10 ml d'hydrogénocarbonate de sodium aqueux, de l'eau (3x10 ml), séchée sur sulfate de sodium, filtrée, évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (éluant : $CHCl_3/MeOH$, 99/1, v/v). Le produit 6 est obtenu avec un rendement de 95 % après cristallisation dans l'éthanol. Rf = 0,14 (éluant $CHCl_3/MeOH$, 98/2, v/v). F = 135-137°C (Ethanol) (lit. (14) : 139°C). Analyse calc. pour : $C_{31}H_{24}N_5O_7$: Calc. C : 64,24 H : 4,14 N : 12,08. Tr. C : 64,20 H : 4,02 N : 12,10. U.V. : λ_{max} (Ethanol 95) : 278 nm. ($\epsilon = 24.000$) 231 nm. ($\epsilon = 41.300$). RMN : $CDCl_3/TMS$: 8,66 (H_2 , s, 1H) 8,53 (H_8 , s, 1H) 8,30-7,10 (H-aromatiques, m, 15H) 6,80 ($H_{1,2}$, d, $J_{1,2} = 4\text{Hz}$, 1H) 6,06 ($H_{2,3}$, m, 2H) 4,30 (H_4 , m, 1H) 4,06 ($H_{5,5''}$, m, 2H).

o-Chlorophénylphosphate-3' (Monométhoxytrityl-5' dibenzoyl-2', N⁶ Ara-A) de triéthylammonium 8.

On prépare, *in situ*, une solution d'o-chlorophénylphosphorodichloride (triazol-1,2,4 ide) (12) dans 1 ml de pyridine anhydre, à partir de 100 mg (0,048 mmol.) d'o-chlorophénylphosphorodichloride, de 162 mg (2,347 mmol.) de triazole-1,2,4. Après 20 minutes d'agitation à température ambiante, 80 mg (0,107 mmol.) du composé 7 sont ajoutés, l'agitation est poursuivie durant 20 mn, on additionne ensuite une solution composée de 0,75 ml de triéthylamine, 0,5 ml d'eau, 0,5 ml de pyridine. La réaction est arrêtée 10 mn après, en ajoutant 8 ml d'hydrogénocarbonate de sodium aqueux.

Le mélange est extrait avec du chloroforme (3x8 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, évaporée, coévaporée au toluène (2x5 ml). Après purification sur colonne de gel de silice (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$, 98/2/0,1, v/v/v) le composé 8 est obtenu avec un rendement de 95 %, après précipitation dans l'éther de pétrole. $R_f = 0,11$ (éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 90/10, v/v). U.V. : λ_{max} (Ethanol 95) : 278 nm. ($\epsilon = 20.700$) 232 nm. ($\epsilon = 33.500$). RMN : CDCl_3/TMS : 8,70 (H_2 , s, 1H) 8,12 (H_8 , s, 1H) 8,10-7,0 (H-aromatiques, m, 26H) 6,82 (H_1 , d, $J_{1,2} = 4\text{Hz}$, 1H) 6,76 (H-aromatiques, m, 2H) 5,98 (H_2 , dd, $J_{2,3} = 2,25\text{ Hz}$, 1H) 5,18 (H_3 , m, 1H) 4,64 (H_4 , m, 1H) 3,72 (OCH_3 , s, 3H) 3,57 ($\text{H}_{5,5'}$, m, 2H).

Dimère Ara A p Ara A 14 complètement protégé.

A une solution du phosphodiester 8 (106 mg, 0,103 mmol.) et du tri-benzoyl-2',3',N⁶ Ara A 6 (58 mg, 0,100 mmol.) dans 0,5 ml de pyridine, on ajoute le mésitylène sulfonyl-1 nitro-3 triazole-1,2,4 (91 mg, 0,307 mmol.). La réaction est arrêtée après 45 mn d'agitation à température ambiante, en ajoutant 0,2 ml d'hydrogénocarbonate de sodium. Après 10 mn, la solution obtenue est versée sur 12 ml d'hydrogénocarbonate de sodium, puis extraite au chloroforme (4x10 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, évaporée, coévaporée au toluène (2x5 ml). Le résidu est fractionné sur colonne de gel de silice (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{pyridine}$, 99/1/0,1, v/v/v). Le dimère 14 est obtenu avec un rendement de 83 % après précipitation dans l'éther de pétrole. $R_f = 0,57$; deux diastéréoisomères (éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95/5, v/v).

Dimère (OH_5')Ara A p Ara A 18 protégé.

Le dimère Ara A p Ara A 14 complètement bloqué (190 mg, 0,122 mmol.) est dissous dans 9 ml d'un mélange chloroforme-méthanol (7-3, v/v) contenant 2 % d'acide benzène sulfonique. La solution résultante est agitée à température ambiante durant 20 mn puis versée dans 6 ml d'hydrogénocarbonate de sodium aqueux, et le produit est extrait au chloroforme (3x10 ml). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau (2x5 ml), séchées sur sulfate de sodium, filtrées, évaporées sous

pression réduite. Après purification sur colonne de gel de silice (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 98/2, v/v), le dimère 18 est obtenu avec un rendement de 90 % après précipitation dans l'éther de pétrole. $R_f = 0,27$ et $0,33$; deux diastéréoisomères (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95/5, v/v).

Dimère Ara A p Ara A (OH_2) 15 protégé.

A une solution du phosphodiester 8 (130 mg, 0,125 mmol.) et du dibenzoyl-2', N⁶ Ara A 5 (67 mg, 0,141 mmol.) dans 0,6 ml de pyridine, on ajoute le mésitylène sulfonyl-1 nitro-3 triazole-1,2,4 (111 mg, 0,375 mmol.). La réaction est arrêtée après 45 mn d'agitation en ajoutant 0,3 ml d'hydrogénocarbonate de sodium aqueux. Après 10 mn, la solution est versée sur 10 ml d'hydrogénocarbonate de sodium aqueux, puis extraite au chloroforme (4x10 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, évaporée et coévaporée au toluène (2x5 ml). Le résidu est fractionné sur colonne de gel de silice (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$, 98/1,8/0,2, v/v/v). Le dimère 15 est obtenu avec un rendement de 75 % après précipitation dans l'éther de pétrole. $R_f = 0,40$; deux diastéréoisomères (éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95/5, v/v).

Trimère Ara A 17 complètement protégé.

A une solution du phosphodiester 16 (28 mg, 0,016 mmol.) et du tribenzoyl-2'3', N⁶ Ara A 6 (9 mg, 0,015 mmol.) dans 0,1 ml de pyridine, on ajoute le mésitylène sulfonyl-1 nitro-3 triazole-1,2,4 (15 mg, 0,049 mmol.). La réaction est arrêtée après 45 mn d'agitation en additionnant 0,1 ml d'hydrogénocarbonate de sodium. Après 10 mn d'agitation, la solution obtenue est versée sur 6 ml d'hydrogénocarbonate de sodium, puis extraite au chloroforme (4x6 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, évaporée et coévaporée au toluène (2x3 ml). Le résidu est fractionné sur colonne de gel de silice (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{Et}_3\text{N}$, 99,9/0,1, v/v). Le trimère Ara A 17 est obtenu avec un rendement de 50 % après précipitation dans l'éther de pétrole. $R_f = 0,51$; $0,68$ quatre diastéréoisomères (éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95/5, v/v).

Tétramère Ara A 19 complètement protégé.

A une solution du phosphodiester 16 (71 mg, 0,041 mmol.) et du dimère détritylé 18 (50 mg, 0,040 mmol.) dans 0,2 ml de pyridine, on ajoute le mésitylène sulfonyl-1 nitro-3 triazole-1,2,4 (37 mg, 0,0124 mmol.). La réaction est arrêtée après 45 mn d'agitation en ajoutant 0,1 ml d'hydrogénocarbonate de sodium. Après 10 mn, la solution obtenue est versée sur 6 ml d'hydrogène-carbonate de sodium, puis extraite au chloroforme (4x6 ml). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, évaporée, coévaporée au toluène (2x5 ml). Le résidu est fractionné sur colonne de gel de silice (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Pyridine}$ 98/2/0,2 v/v/v). Le tétramère Ara A 19 est obtenu avec un rendement de 82 % après précipitation dans l'éther de pétrole. $R_f = 0,40$ (éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95/5, v/v).

Déprotection et purification du dimère 15, du trimère 17 et du tétramère 19.**a) Déprotection :**

Une solution de (0,020 mmol.) d'oligonucléotide totalement protégé, (0,3M) de nitro-4 syn-benzaldoxime et (0,3M) de N,N,N,N-tétraméthyl-1,1,3,3 guanidine, dans un mélange dioxanne-eau (4 ml, 1/1, v/v) est agitée durant 4 heures à température ambiante. Au bout de cette période, on ajoute 5 gouttes de N,N,N,N-tétraméthyl-1,1,3,3 guanidine, et la solution est agitée pendant 16 heures supplémentaires. Après évaporation sous pression réduite, on ajoute à la gomme obtenue 5,4 ml d'ammoniaque concentré (20 %), cette solution est chauffée 24 heures à 50°C dans un tube scellé. Le mélange réactionnel brut est neutralisé par la résine Dowex 50 W-X₂ (pyridinium), la résine est filtrée, lavée à l'eau (3x20 ml) à l'EtOH (3x20 ml). La phase eau-éthanol est évaporée à sec. Le résidu est dissous dans 40 ml d'eau. La phase aqueuse est lavée à l'éther (10x30 ml), puis évaporée sous pression réduite. Au résidu obtenu, on ajoute 4 ml d'acide acétique aqueux à 80 %. la solution ainsi formée est agitée à température ambiante durant 1 h 15 mn, puis évaporée avec de l'eau jusqu'à pH neutre, puis successivement lavée avec du chloroforme (15x30 ml) et de l'éther éthylique (5x20 ml). La phase aqueuse est évaporée sous pression réduite.

b) Purification

Le résidu obtenu précédemment est chromatographié sur colonne (1,5x15 cm) de DEAE-Sephadex A-25 (forme HCO_3^-). L'élution est effectuée avec un tampon aqueux d'hydrogencarbonate de triéthylammonium (pH = 7,5) selon un gradient linéaire de 10^{-3}M à 1M. Des fractions de 11 ml sont collectées, celles qui contiennent l'oligonucléotide sont réunies, évaporées sous pression réduite, coévaporées cinq fois avec de l'eau, puis lyophilisées.

Le dimère 4, le trimère 3 et tétramère 2 sont obtenus avec des rendements respectifs de 93 %, 93 % et 95 %. Notons que ces rendements ont été calculés par mesure de densité optique.

CONTROLE DE PURETE PAR CCM DES OLIGONUCLEOTIDES

	A	B	C
	-----	-----	-----
<u>2</u>	0,47	0,24	0,50
<u>3</u>	0,52	0,37	0,50
<u>4</u>	0,57	0,58	0,61

A = isopropanol/ NH_3 /eau (7/1/2 ; v/v)

B = AMOAC (1M)/EtOH 95 (2/8 ; v/v)

C = isobutanol/ NH_3 /eau (66/33/1; v/v)

DIGESTION ENZYMATIQUE

A une solution de l'oligonucléotide (3-4 unités A_{254}) dans 25 μl d'eau, on ajoute successivement 5 μl d'une solution aqueuse 0,1 M de chlorure de magnésium, 5 μl d'une solution aqueuse 1M tris-HCl (pH = 8,9), 80 μl d'eau et 2 μl de solution-stock de phosphodiesterase de venin de *crotalus durissus terrificus*. La solution obtenue est incubée à 37°C durant 36 heures puis chauffée à 80°C durant 2 minutes pour dénaturer l'enzyme. L'hydrolysat est directement analysé par CLHP : on trouve deux pics correspondant respectivement au nucléotide et au nucléoside (voir TABLEAU I).

REFERENCES

1. Aucun oligonucléotide de l'Ara A n'avait été rapporté dans la littérature. Cependant, durant l'élaboration de ce travail (H.B. Lazrek, Thèse d'Etat, Dec. 1982), C. Gioeli, J.B. Chattopadhyaya, A.F. Drake et B. Oberg ont publié la synthèse du trimère de l'Ara A (Chem. Scripta, 1982, 19, 13-17) par une voie différente.
2. J. Doornbos, J.L. Barascut, H.B. Lazrek, J.L. Imbach, J. Van Westrenen, G.M. Visser, J.H. Van Boom et C. Altona, Nucleic Acid Res., 1983, 11, 4583.
3. H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch et H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 3821.
4. S.A. Narang, K. Itakura et R.H. Wightman, Can. J. Chem. 1972, 50, 769.
5. W.T. Markiewicz, J. Chem. Res. (8), 1979, 24.
6. W.T. Markiewicz, E. Biala, R.W. Adamiak, W. Greskowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, J. Stawinski et M. Wiewiorowski, Nucleic Acid Res., Symposium Series, 1980, 7, 115.
7. W. Steglich et G. Hofle, Angew. Chem. Int. Ed., 1969, 8, 981.
8. G. Hofle, W. Steglich et H. Vorbruggen, Angew. Chem. Int. Ed., 1978, 17, 569.
9. K.K. Ogilvie, Can. J. Chem., 1973, 51, 3799.
10. H. Takaku, M. Kato, M. Yoshida et R. Yamaguchi, J. Org. Chem., 1980, 45, 3347.
11. M.J. Gait, M. Single et R.C. Sheppard, Nucleic Acid Res., 1980, 8, 1080.
12. G.D. Farland et P.M. Borer, Nucleic Acid Res., 1979, 7, 1067.
13. J. Engels, Tetrahedron Letters, 1980, 21, 4233.
14. J.L. Aubagnac, P.M. Devienne, R. Combarieu, J.L. Barascut, J.L. Imbach et H.B. Lazrek, Org. Mass. Spectra, 1983, 18, 361.

---oOo---