

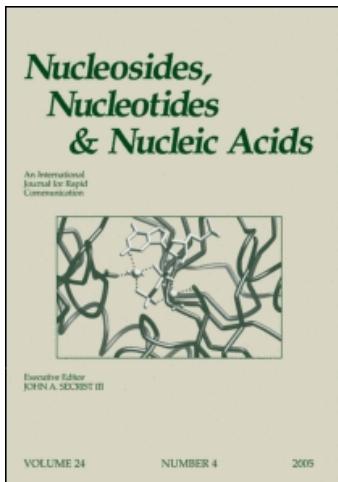
This article was downloaded by:

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>

Synthèse de Tetrathymidylates Lies de Facon Covalente a des Derives de L'ellipticine

Claudie Gautier^a; Philippe Sizun^b; Tam Huynh-dinh^a; Abdelkader Namane^a; Claude Paoletti^b; Jean Igolen^a

^a Département de Biochimie et Génétique Moléculaire, Unité de Chimie Organique, Paris cédex 15, France

^b Laboratoire de Biochimie, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France

To cite this Article Gautier, Claudie , Sizun, Philippe , Huynh-dinh, Tam , Namane, Abdelkader , Paoletti, Claude and Igolen, Jean(1990) 'Synthèse de Tetrathymidylates Lies de Facon Covalente a des Derives de L'ellipticine', Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 9: 1, 1 – 19

To link to this Article: DOI: 10.1080/07328319008045105

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/07328319008045105>

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.

SYNTHESE DE TETRATHYMYDYLATES LIES DE FACON COVALENTE A DES DERIVES DE L'ELLIPTICINE

Claudie Gautier⁺, Philippe Sizun⁺⁺, Tam Huynh-Dinh⁺, Abdelkader Namane⁺, Claude Paoletti⁺⁺ et Jean Igolen⁺

⁺ Unité de Chimie Organique, Département de Biochimie et Génétique Moléculaire, UA-CNRS 487, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cédex 15, France

⁺⁺ Laboratoire de Biochimie, Institut Gustave-Roussy, Inserm U140, CNRS LA 147, rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France

Abstract: Tetrathymidylate has been covalently linked at its 3' extremity to ellipticine derivatives (9-hydroxy-N-2-methylellipticinium acetate 1 or 9-hydroxyellipticine 2) via a ω -aminoacyl arm. The synthesis consists of two steps: esterification of the oligodeoxynucleotide 3' hydroxyl group with a linear ω -aminoacid followed by oxidative addition of 1 or 2. Another approach consists of forming a phosphodiester bond between the 3' phosphate group of a trithymidylate and the 5' hydroxyl group of a thymidine residue covalently linked to 2. Both pathways led to the same product as shown by HPLC.

Introduction

La régulation de l'expression génétique, généralement assurée dans l'organisme par la reconnaissance d'acides nucléiques simple ou double brin par des protéines hautement spécifiques [1], peut être envisagée du point de vue pharmacologique si l'on dispose de molécules ayant une grande affinité et une haute spécificité vis-à-vis

d'une séquence de bases donnée. Les oligonucléotides synthétiques constituent, en ce sens, un matériel intéressant et très prometteur: en effet, ils ont été utilisés avec succès pour modifier la traduction ou le couplage entre la transcription et la traduction des ARN messagers chez les bactéries [2]. Miller et coll. [3,4] ont également montré que les oligodésoxynucléosides méthylphosphonates pouvaient assurer le contrôle spécifique de l'expression des gènes dans les cellules vivantes en intervenant au niveau de la traduction ou de l'épissage des ARN messagers. Plus récemment, la fixation covalente d'un agent intercalant dérivé de l'acridine sur des oligodésoxynucléotides [5,6,7,8] a conduit à des molécules présentant une affinité pour leur séquence complémentaire accrue par la présence de l'intercalant; ces molécules ont manifesté des propriétés biologiques intéressantes liées au contrôle de l'expression des gènes [9,10]. Dans le même ordre d'idée, nous avons synthétisé des oligodésoxynucléotides liés de façon covalente à des dérivés de l'ellipticine: l'acétate de N-2-méthylhydroxy-9-ellipticinium 1 et l'hydroxy-9-ellipticine 2 (Fig. 1). Ces molécules intercalantes présentent une bonne affinité pour l'ADN double brin [11] (Kapp de l'ordre de 10^6 M⁻¹) et n'ont pas de spécificité de bases ou de séquences de bases. Elles ont été fixées à l'extrémité 3' d'un tétramère de thymidine par l'intermédiaire d'une chaîne polyméthylène de longueur variable destinée à assurer un degré de liberté optimum aux deux parties des molécules obtenues. La réaction choisie pour effectuer la liaison entre l'oligonucléotide acylé en 3' et l'une ou l'autre des molécules intercalantes permet d'obtenir des composés ayant des propriétés fluorescentes. Ainsi, leur

détection par fluorescence a été possible au cours de la synthèse, puis au cours de l'étude de l'interaction de ces molécules avec les acides nucléiques [12].

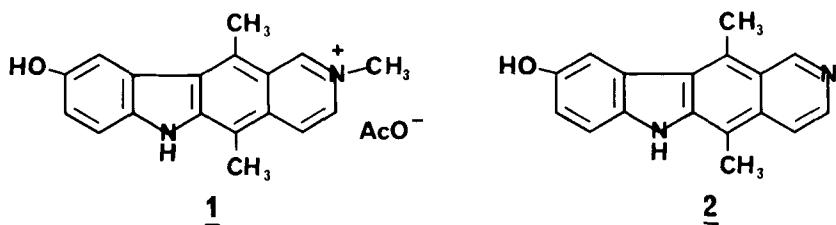


FIGURE 1

Résultats

La synthèse des tétrathymidylates liés de façon covalente aux dérivés de l'ellipticine 1 ou 2 comprend deux étapes essentielles: l'hydroxyle 3' de l'oligodésoxynucléotide protégé en 5' est estérifié par un ω -aminoacide linéaire dont la fonction amine est temporairement bloquée. L'élimination des groupements protecteurs conduit au tétrathymidylate acylé en 3' par une chaîne comportant une fonction amine libre. Cette chaîne est fixée sur le dérivé de l'ellipticine 1 ou 2 au cours d'une deuxième étape qui met en jeu le caractère électrophile de la forme oxydée des composés 1 et 2.

Le tétramère de thymidine a été synthétisé par la méthode classique au phosphotriester [13-15]. Il est débarrassé de ses groupements protecteurs au niveau des phosphates (groupement O-chlorophényle) et au niveau de l'hydroxyle 3' (groupement benzoyle) par traitement par la pyridine aldoximate de tétraméthylguanidinium (PAO-TMG) pendant une nuit puis par l'ammoniaque 5 h à 50°C. Après purification par chromatographie en phase inverse, le O-diméthoxytrityl-5'-tétrathymidylate 3 est obtenu avec des rendements variant de 80 à 95%. 3 (Fig. 2) est estérifié par l'acide

N-diméthoxytritylaminohexanoïque dans la pyridine en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) [16-17] et de diméthylaminopyridine (DMAP) [18]. Après traitement par l'acide acétique aqueux et purification par chromatographie en phase inverse, le tétrathymidylate substitué **4a** est obtenu avec un rendement de 49%.

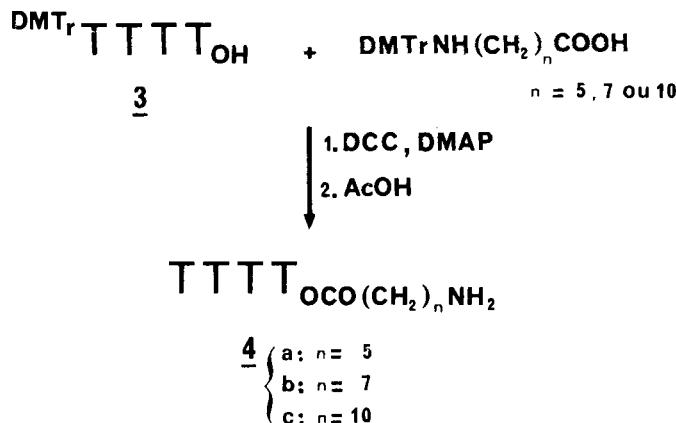


FIGURE 2

Afin d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne polyméthylène sur l'interaction des tétramères de thymidine liés aux dérivés de l'ellipticine avec les acides nucléiques, nous avons préparé de la même façon, les tétrathymidylates possèdant une chaîne à 7 et 10 groupements méthylènes. Ainsi 4b et 4c ont été obtenus à partir des acides N-diméthoxytritylaminio-8-octanoïque et N-diméthoxytritylaminio-11-undécanoïque respectivement avec des rendements de 52 et 66%.

L'oxydation enzymatique du dérivé ellipticinium 1, mise au point par C. Auclair et C. Paoletti [19] a été utilisée pour former une liaison covalente entre 1 et les composés 4. En effet, la réaction conduit à

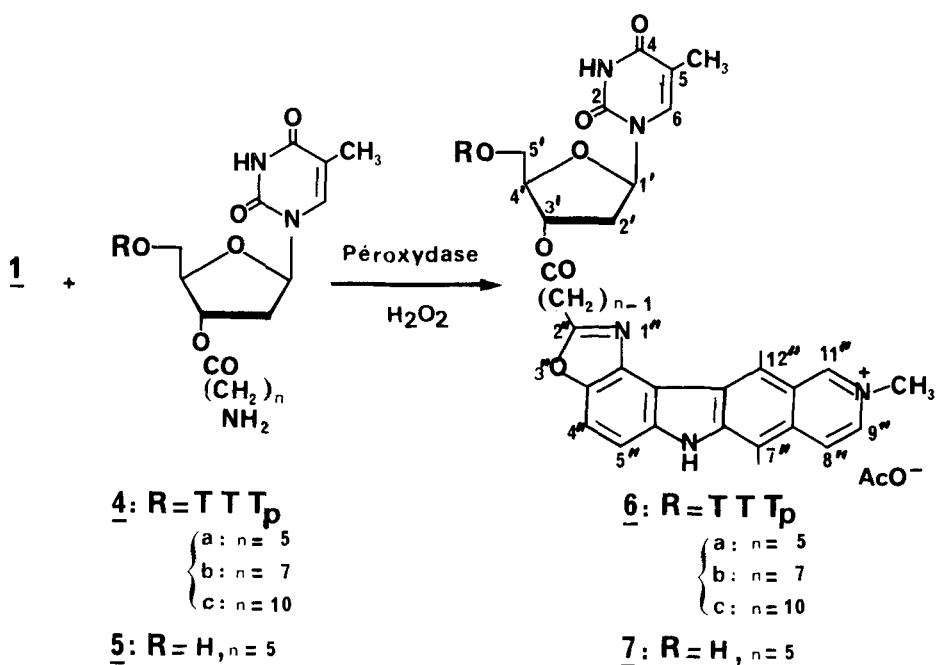


FIGURE 3

une paraquinonimine très réactive qui peut subir l'attaque de divers nucléophiles présents dans le milieu réactionnel [20,21]. L'oxydation est catalysée par la peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène dans un tampon phosphate, pH voisin de 7. Dans ces conditions, et après purification par chromatographie, basse puis haute pression, **4a-c** conduisent à un composé fluorescent **6** avec un rendement de 10% (Fig. 3). La réaction effectuée avec la thymidine acylée **5** (préparée dans les mêmes conditions que **4**) conduit à **7** (Fig. 3) avec un rendement nettement supérieur (45%), comparable aux rendements obtenus avec des amines simples [20]. Le produit secondaire le plus important de la réaction résulte de l'addition du peroxyde d'hydrogène sur la forme oxydée de **1** [19,20]. La formation d'une liaison entre le tétrathymidylate acylé **4a** et l'hydroxy-9-ellipticine **2** est rendue plus difficile en raison de la plus

faible réactivité du produit d'oxydation de 2 vis-à-vis de nucléophiles [19]. De plus, la catalyse enzymatique par la peroxydase s'est révélée inappropriée en raison de la faible solubilité du dérivé ellipticine (même sous forme bromhydrate) en milieu aqueux. L'oxydation de 2 peut être réalisée avec succès par l'oxyde de manganèse [22] dans un mélange DMF-méthanol (10/0,2). Cependant l'addition du nucléophile 4a conduit au composé 12 avec un rendement de seulement 2% (Fig. 4).

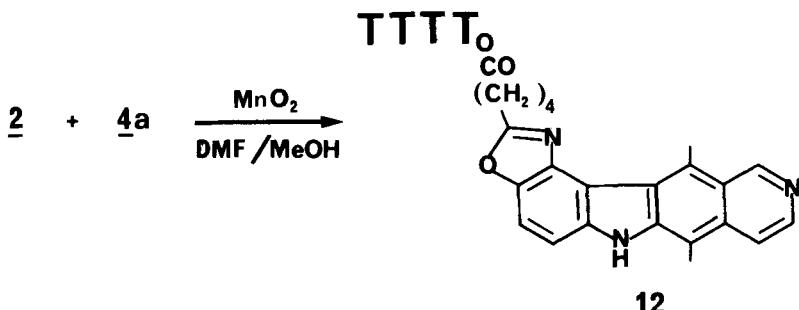
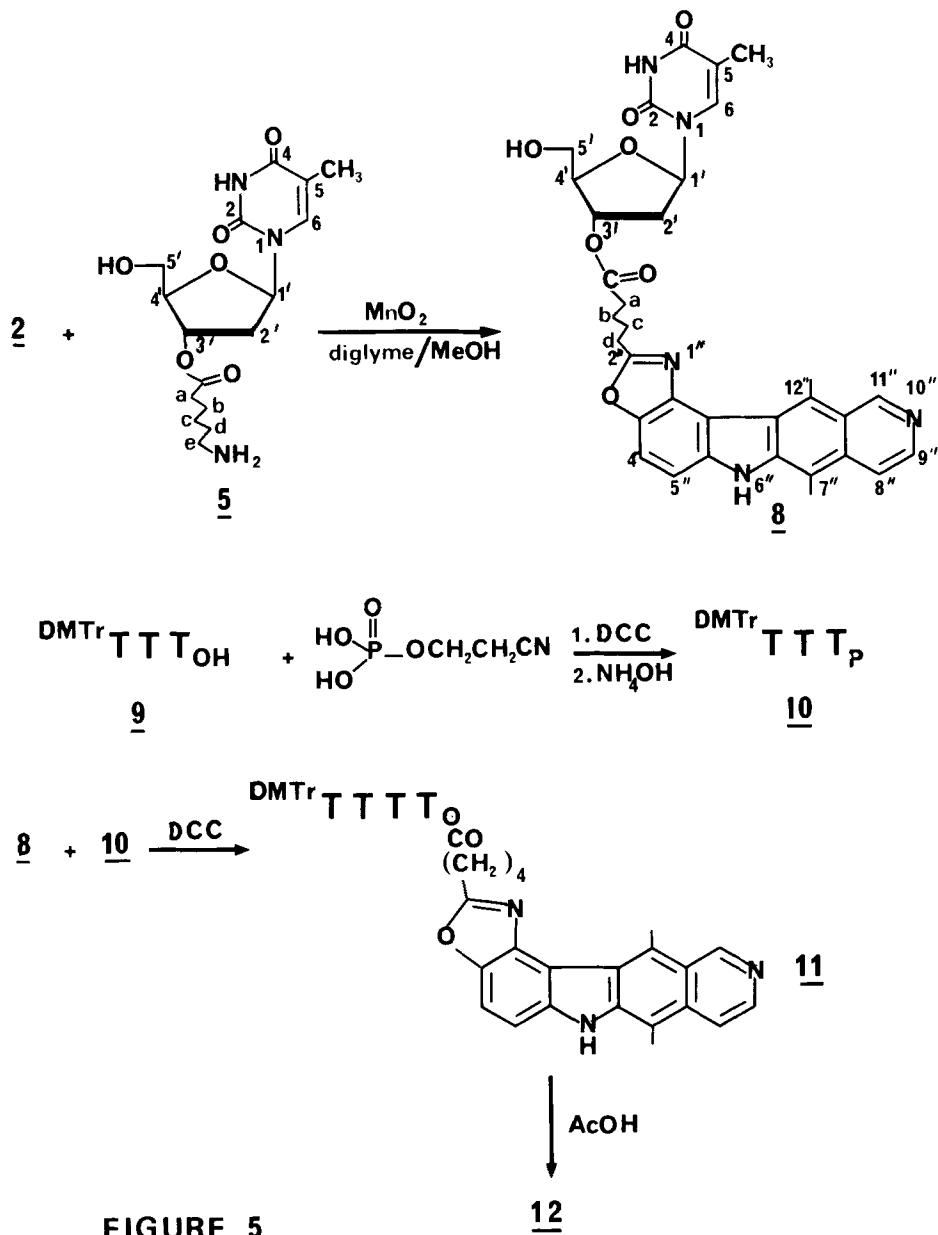


FIGURE 4

Récemment, Sundaramoorthi et coll. [23] ont montré que l'oxydation de 2 par le MnO_2 en présence d'amines simples conduit aux produits d'addition avec des rendements compris entre 65 et 88%. Ce résultat nous a amené à modifier le schéma de synthèse de 12. Il n'est pas envisageable de réaliser une liaison entre l'hydroxyle 3' d'un tétramère et un dérivé de 2 porteur d'une chaîne à fonction acide carboxylique, ce dernier composé se transformant en présence de DCC (mise en évidence par CCM). Cependant, il est possible d'obtenir 12 en formant une liaison phosphodiester entre un trithymidylate et la thymidine substituée par le groupement oxazolopyridocarbazole, 8 (Fig. 5). Le composé 8 est préparé par



oxydation de 2 à l'aide du MnO₂ dans le diglyme-méthanol (9/1:v/v) en présence de 5. L'addition se fait avec un rendement de 65%. Le trimère phosphorylé en 3', 10, est obtenu à partir du trithymidylate 5' protégé, 9, soumis à l'action du phosphate de cyanoéthyle selon la méthode décrite par Tener [24]; le groupement cyanoéthyle est éliminé par l'ammoniaque (2 h à 50°C). Le couplage entre 8 (1,5 eq) et 10 s'effectue dans la pyridine, en présence de DCC [25] et conduit au bout de 24 h à deux nouveaux produits dont l'un seulement présente des propriétés fluorescentes. Ces composés sont séparés par chromatographie en phase inverse. La détritylation de l'intermédiaire fluorescent 11 conduit à un composé qui possède le même Rf en CCM et le même temps de rétention en CLHP que le produit 12 obtenu à partir de 4a et de 2. 12 est obtenu de cette façon avec 6,5% de rendement par rapport à 10.

La pureté des produits finaux et des intermédiaires lorsqu'ils sont solubles dans l'eau a été vérifiée par CLHP en phase inverse. Les composés ont été caractérisés par leur spectre de masse (mode FAB). A. Gouyette et coll. [26] d'une part et V.K. Kansal et coll. [22] d'autre part, ont montré que l'addition d'une amine sur le produit d'oxydation des dérivés 1 ou 2 de l'ellipticine conduisait à la formation d'un cycle oxazole: les déplacements chimiques des protons du cycle polyaromatique des composés 7 et 8 sont compatibles avec la présence de ce groupement fonctionnel dans nos dérivés.

Partie Expérimentale

Les aminoacides proviennent de chez Sigma et sont protégés par un groupement diméthoxytrityle selon la méthode décrite par

Hernandez et coll. [27]. L'acétate de N-2-méthylhydroxy-9-ellipticinium et le bromhydrate d'hydroxy-9-ellipticinium viennent de la Sanofi. L'hydroxy-9-ellipticine 2 est obtenue à partir de son bromhydrate selon la méthode décrite par R.W. Guthrie et coll. [28]. La peroxydase de raifort provient de chez Sigma, l'oxyde de manganèse de chez Aldrich.

La purification par chromatographie liquide haute performance est effectuée sur un appareil série 3B (Perkin Elmer) muni d'un détecteur UV LC 75 (Perkin Elmer). L'information et l'intégration sont traitées par une station de données 3600 (Perkin Elmer). Le contrôle de pureté est réalisé sur un système CLHP série 4 (Perkin Elmer) piloté par une station de données 3600 (Perkin Elmer) et muni d'un détecteur à barettes de diodes HP 1040 M (Hewlett Packard). L'information est traitée par un microordinateur HP 9000 série 300 (Hewlett Packard).

Les spectres de masse sont enregistrés sur un spectromètre VG 70-250 équipé avec un canon FAB. Le voltage d'accélération est de 6 kV.

Les spectres RMN sont enregistrés sur un spectromètre 300 SML (Bruker) couplé à un ordinateur Aspect 3000. Les expériences sont réalisées à 25°C dans le d₆-DMSO (99,8%); le TMS est utilisé comme référence interne. L'attribution des déplacements chimiques aux différents protons est effectuée par découplage homonucléaire séquentiel.

Les mesures d'absorption sont réalisées sur un spectrophotomètre Uvikon 810 (Kontron). Les spectres sont enregistrés dans l'eau pour une concentration 10⁻⁵ M. Les déterminations des propriétés de fluorescence sont effectuées sur un spectrofluorimètre SFM 25 (Kontron).

O-Diméthoxytrityl-5'-tétra- et trithymidylates **3** et **9**

A une solution de tétramère ou de trimère de thymidine totalement protégés (0,10 mmole) dans un mélange eau-dioxane (1/1, v/v, 20 ml) sont ajoutés 0,732 g de pyridine-2-aldoxime (6 mmoles) et 0,744 ml de N₁,N₁,N₃,N₃ tétraméthylguanidine (6 mmoles). Le mélange est laissé à température ambiante pendant une nuit puis évaporé à sec. Le résidu est dissous dans 30 ml d'ammoniaque à 20% et la solution est chauffée à 50°C pendant 5 h, refroidit et évaporé à sec. Le résidu est lavé à l'éther éthylique et chromatographié sur une colonne Lichroprep RP 18 (1,2 x 10 cm) en utilisant un gradient par palier de méthanol (0 à 50%) dans le bicarbonate de triéthylammonium (BTEA) 0,05 M, pH 7. Les fractions contenant le produit **3** ou **9** sont rassemblées et évaporées à sec. Le résidu est repris par 5 ml d'eau et lyophilisé. Le produit désiré est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement variant de 80 à 95%.

O-(amino-6-hexanoyl)-3'-tétrathymidylate **4a**

150 mg de O-diméthoxytrityl-5'-tétrathymidylate **3** (0,10 mmole) et 216 mg d'acide N-diméthoxytritylaminohexanoïque (0,50 mmole) sont séchés par coévaporation avec 3 x 5 ml de pyridine anhydre puis dissous dans 5 ml de pyridine anhydre. 206 mg de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (1,0 mmole) et 61 mg de N,N diméthylaminopyridine (DMAP) (0,5 mmole) sont alors additionnés à la solution. Le milieu est laissé sous agitation pendant 6 h à température ambiante. Après addition d'eau (1 ml), le milieu est filtré et évaporé à sec. Le résidu est repris dans un minimum de CH₂Cl₂. L'addition d'éther éthylique conduit à la précipitation du composé qui est filtré puis dissous dans un mélange THF-méthanol (7/3, v/v) et chromatographié sur colonne Sephadex LH20. Les

fractions contenant le produit sont rassemblées et évaporées à sec. Le résidu est traité par l'acide acétique à 80% (5 ml) pendant 20 min, à température ambiante. On ajoute alors du toluène et le mélange est évaporé à sec. L'opération est répétée plusieurs fois. Le résidu est purifié par chromatographie en phase inverse sur une colonne Lichroprep RP 18 (1,2 x 10 cm) en utilisant un gradient par palier de méthanol (0 à 40%) dans l'eau. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et évaporées à sec. Le résidu est lyophilisé. On obtient 64 mg de composé 4a sous forme de poudre blanche (rendement 49%).

De la même façon, la réaction de 3 (0,150 g, 0,1 mmole) avec l'acide N-diméthoxytritylaminio-8-octanoïque (0,230 g, 0,5 mmole) ou avec l'acide N-diméthoxytritylaminio-11-undécanoïque (0,251 g, 0,5 mmole) conduit à l'O-(amino-8-octanoyl)-3'-tétrathymidylate, 4b (0,070 g) et à l'O-(amino-11-undécanoyl)-3'-tétrathymidylate 4c (0,095 g) avec un rendement de 52 et 68% respectivement.

Après passage sur colonne échangeuse d'ions, Dowex 50W, forme NH₄⁺, la pureté des produits est vérifiée par CLHP sur une colonne Nucleosil 5-C18, éluée par un gradient d'acetonitrile (5 à 40% en 20 min.) dans l'acétate de triéthylammonium 0,01 M, pH 7. Elle est supérieure à 99%.

4a: UV: 264 nm, 207 nm. Masse: 1268: [M+H]⁺

4b: UV: 267 nm, 207 nm. Masse: 1296: [M+H]⁺, 1318: [M+Na]⁺, 1334: [M+K]⁺

4c: UV: 267 nm, 207 nm. Masse: 1338: [M+H]⁺

O-(amino-6-hexanoyl)-3'-thymidine 5

1,04 g de O-diméthoxytrityl-5'-thymidine (2 mmoles) et 2,6 g d'acide N-diméthoxytritylaminio-6-hexanoïque sont coévaporés 2 fois

avec la pyridine. Après dissolution du mélange dans 5 ml de pyridine, on ajoute 1,65 g de DCC (8 mmoles) et 0.24 g de DMAP. On laisse 3 h sous agitation (contrôle CCM). On ajoute 1 ml d'eau. La dicyclohexylurée qui a précipité, est filtrée et la solution est évaporée à sec. Le résidu est repris dans 30 ml de dichlorométhane, lavé 2 fois avec 30 ml de bicarbonate de sodium saturé, 2 fois à l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, réduite à un petit volume et précipitée à l'éther de pétrole. Le produit est chromatographié sur gel de Sephadex LH20 élué avec un mélange THF/méthanol (95/5). Le contenu du premier pic détecté à 254 nm est évaporé à sec. On obtient 1,38 g de composé protégé. L'intermédiaire est alors traité par 15 ml d'acide acétique à 80% pendant 4 heures. L'acide acétique est éliminé par coévaporation avec du toluène. Le résidu est lavé à l'éther éthylique, dissous dans l'eau et chromatographié sur gel de Sephadex G10 élué au BTEA 0,05 M. Les fractions contenant le produit sont rassemblées et lyophilisées. Le produit est alors purifié par CLHP sur colonne Nucleosil 5-C18 éluée par un gradient d'acétonitrile (0 à 50% en 20 min) dans l'acétate de triéthylammonium 10^{-2} M, pH 7. La fraction contenant le composé 5 est évaporée à sec et le résidu est lyophilisé. On obtient 312 mg de 5 (45%) sous forme de poudre blanche.

UV: 207 nm (6600), 267 nm (6700). Masse: 356: $[M+H]^+$, 230 $[S]^+$, 127: $[B+2H]^+$. 1H RMN: 1,3 ppm (2H, m, J: 7,5 Hz, CH_2 c); 1,4 ppm (2H, m, J: 7,5 Hz, CH_2 b); 1,5 ppm (2H, m, J: 7,5 Hz, CH_2 d); 1,8 ppm (3H, d, J: 1,5 Hz, CH_3 5); 2,15-2,3 ppm (2H, ABXY, J: 2Hz, 6Hz, 14 Hz, 5,5 Hz, 8,5 Hz, H2', H2''); 2,35 ppm (2H, t, J: 7,5 Hz, CH_2 a); 2,6 ppm (2H, t, J: 7,5 Hz, CH_2 e); 3,6 ppm (2H, d, J: 3,5 Hz, H5', H5''); 4,0 ppm (1H, dt, J: 3,5 Hz, 2 Hz, H4'); 5,2 ppm (1H, dt, J: 5,5 Hz, 2Hz, H3'); 6,2 ppm (1H, dd, J: 8,5 Hz, 6 Hz, H1'); 7,75 ppm (1H, d, J: 1,5 Hz, H6).

Composé 6a-c

60 mg du composé 4a (0,046 mmole) et 8 mg d'acétate de N2-méthylhydroxy-9-ellipticinium 1 (0,023 mmole) sont dissous dans 40 ml de tampon phosphate 0,02 M, pH 7,2. On ajoute au milieu 0,8 mg de peroxydase (HRP). Après dissolution de l'enzyme, 1,2 ml d'une solution d'eau oxygénée 20 mM sont additionnés goutte à goutte. La solution est alors filtrée et évaporée à sec. Le résidu est prépurifié par chromatographie en phase inverse sur une colonne Lichroprep RP 18 éluée par un gradient par palier de méthanol (0 à 60%) dans l'eau. Les fractions contenant le produit 15a sont rassemblées et évaporées à sec. La purification est achevée par CLHP sur une colonne Nucleosil 5-C18 éluée par un gradient d'acétonitrile (0 à 60%) dans l'acétate de triéthylammonium 0,01 M, pH 7. Les fractions appropriées sont évaporées à sec et lyophilisées. Le produit est passé sur échangeuse d'ions Dowex 50W, forme NH_4^+ et après lyophilisation, le composé 15a est obtenu sous forme d'une poudre jaune (4,4 mg) avec 11% de rendement.

De la même façon 1 (0,5 eq.) en présence de 4b (0,056 g, 0,042 mmole) ou de 4c (0,040 g, 0,029 mmole) conduit aux composés 6b (4 mg, 10% de rendement) et 6c (3 mg, 12% de rendement) respectivement.

6a: UV: 271 nm (47800); 318 nm (47000). Fluorescence: excitation: 318 nm; émission: 525 nm. Masse: 1576: $[\text{M}-\text{H}+\text{K}]^+$.

6b: UV: 270 nm (45000); 318 nm (44400). Fluorescence: excitation: 318 nm; émission: 525 nm. Masse: 1566: $[\text{M}]^+$, 1588: $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}]^+$, 1610: $[\text{M}-2\text{H}+2\text{Na}]^+$, 1632: $[\text{M}-3\text{H}+3\text{Na}]^+$, 1604: $[\text{M}-\text{H}+\text{K}]^+$.

6c: UV: 270 nm (29500); 317 nm (25000). Fluorescence: excitation: 315 nm; émission: 530 nm. Masse: 1630: $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}]^+$, 1652: $[\text{M}-2\text{H}+2\text{Na}]^+$, 1674: $[\text{M}-3\text{H}+3\text{Na}]^+$, 1696: $[\text{M}-4\text{H}+4\text{Na}]^+$.

Composé 7

240 mg (0,67 mmole) de 5 et 45 mg (0,13 mmole) d'acétate de N-2-méthylhydroxy-9-ellipticinium sont dissous dans 100 ml de tampon phosphate 20 mM, pH 7. On ajoute alors 2 mg de peroxydase de Raifort. La solution est maintenue sous agitation vive à température ambiante. 5 ml d'une solution d' H_2O_2 50 mM sont ajoutés goutte à goutte. La réaction est terminée quand la coloration jaune de la solution reste stable. On laisse sous agitation pendant 12 h. La solution est alors filtrée puis déposée sur colonne XAD 2 (SERVA) préalablement équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium 0,02 M, pH 4,5 contenant 1% de méthanol. L'élution est effectuée avec ce tampon acétate progressivement enrichi en méthanol. La fraction contenant le composé 7, facilement détectable par sa fluorescence à 313 nm, est évaporée à sec. Le produit est redissous dans l'eau et lyophilisé. La pureté du produit est contrôlée en CLHP sur colonne μ Bondapak 5-C18 éluée par un mélange eau-méthanol (30/70) contenant 1 g d'heptane sulfonate et 3 ml d'acide acétique par litre.

On obtient 41 mg de 7 (46%).

UV: 314 nm, 278 nm, épaulement à 305 nm. Fluorescence: excitation: 317 nm; émission: 550 nm. Masse: 626: $[M]^+$. RMN: 1,69 ppm; (3H, s, $CH_3CO_2^-$); 1,76 et 1,79 ppm (5H, m, CH_3 5, CH_2); 1,94 ppm (2H, m, J: 7,5 Hz, CH_2). 2,21 et 2,25 ppm (2H, ABXY, J: 2Hz, 6 Hz, 14 Hz, 5,5 Hz, 8,5 Hz, H2', H2"'); vers 2,5 ppm (CH_2 d); 2,89 ppm (3H, s, CH_3 7" ou 12"); 3,12 ppm (2H, t, J: 7,5 Hz, CH_2 a); 3,62 ppm (2H, d, J: 3,5 Hz, H5', H5"); 3,86 ppm (3H, s, CH_3 7" ou 12"); 3,98 ppm (1H, dt, J: 3,5 Hz, 2 Hz, H4'); 4,41 ppm (3H, s, N- CH_3), 5,25 ppm (1H, dt, J: 6 Hz, 2 Hz,

H3'); 6,16 ppm (1H, dd, J: 8,5 Hz, 6 Hz, H1'); 7,70 ppm (1H, s, H6); 7,69 et 7,95 ppm (2H, AB, J: 8,5 Hz, H4" et H5"); 8,32 ppm (2H, AB, J: 7 Hz, H8" et H9"); 9,85 ppm (1H, s, H11").

Composé 8

L'hydroxy-9-ellipticine 2 (50 mg, 0,19 mmole) et le composé 5 (135 mg, 0,38 mmole) sont dissous dans un mélange de méthoxy-2-éthyléther-méthanol (9/1, v/v) (25 ml). On ajoute alors 200 mg de MnO₂ (2,30 mmoles). Le milieu réactionnel est laissé une nuit sous agitation à température ambiante. Après filtration du MnO₂ et évaporation du solvant, le résidu obtenu est dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ et précipité à l'éther de pétrole. Le produit brut est chromatographié sur gel de Sephadex LH20 élué avec un mélange THF-CH₃OH (70/30: v/v). Les fractions contenant le composé 8 fluorescent sont rassemblées et évaporées à sec. A ce stade, le solide est insoluble dans le dichlorométhane et la purification de 8 est achevée par lavage de la poudre avec ce solvant. On obtient 60 mg de composé 8 sous forme de poudre

Rf (CH₂Cl₂/MeOH/TEA: 70/30/2): 0,30. F: 225°C. Masse: 612: [M+H]⁺.

RMN: 1,72 ppm (5H, m, CH₃ 5 et CH₂ b); 1,95 ppm (2H, m, J: 7,5 Hz, CH₂ c); 2,25 ppm (4H, m, CH₂ a et H2', H2"); 2,82 ppm (3H, s, CH₃ 7" ou 12"); 3,10 ppm (2H, t, J: 7,3 Hz, CH₂ d); 3,62 ppm (2H, t, J: 4 Hz, H5', H5"); 3,86 ppm (3H, s, CH₃ 7" ou 12"); 3,98 ppm (1H, d, J: 1,8 Hz, H4'); 5,22 ppm (1H, dt, J: 6 Hz, 2 Hz, H3'); 6,18 ppm (1H, dd, J: 8,4 Hz, 6 Hz, H1'); 7,56 ppm et 7,87 ppm (2H, AB, J: 8,7 Hz, H4" et H5"); 7,72 ppm (1H, s, H6); 7,93 ppm et 8,44 ppm, 2H, AB, J: 6 Hz, H8" et H9"); 9,70 ppm (1H, s, H11"); 11,57 ppm (1H, s, NH).

O-Diméthoxytrityl-5'-phosphate-3'-tétrathymidylate 10

Le sel de pyridinium du phosphate de cyanoéthyle est préparé selon la méthode décrite par Tener [24].

100 mg de O-diméthoxytrityl-5'-trithymidylate 2 (0,074 mmole) sont coévaporés avec 1 ml de pyridine. On ajoute alors 2 ml d'une solution 0,1 M d'agent phosphorylant. Le mélange est évaporé à sec et le résidu est séché par coévaporation avec la pyridine (3 x 2 ml). Les produits sont dissous dans 2 ml de pyridine anhydre et 90 mg de DCC (0,44 mmole) sont additionnés. Le mélange réactionnel est laissé 48 h sous agitation, à température ambiante. On ajoute alors 1 ml d'eau et laisse précipiter la dicyclohexylurée (DCU) pendant 1/2 h. Le milieu est filtré puis évaporé à sec. Le résidu est traité par l'ammoniaque à 20% (2 ml) pendant 2 h à 50°C afin de libérer le groupement cyanoéthyle. L'ammoniaque est chassée sous vide. Le brut réactionnel est repris dans un minimum de BTEA 0,05 M, pH 7 et déposé sur colonne de silice en phase inverse Lichroprep RP 18. L'élution se fait par un gradient par palier de méthanol (0 à 50%) dans le BTEA. Les fractions contenant le produit 10 sont évaporées et le résidu est lyophilisé. On obtient 55 mg de composé 10 (45%).

Rf Silice Merck 60F₂₅₄ (Isopropanol/eau/NH₄OH: 4/1/1): 0,25.

Composé 12

Méthode A

59 mg de composé 4a (0,047 mmole) et 5 mg de 2 sont dissous dans 0,08 ml de méthanol. On ajoute alors 1,5 ml de DMF et 40 mg de MnO₂ (0,46 mmole). Après 36 h d'agitation le milieu réactionnel, rouge sang, est débarrassé du MnO₂ par filtration et le filtrat évaporé à sec. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice Lichroprep RP 18 éluée par un gradient par palier de méthanol (0 à

50%) dans l'eau. Les fractions contenant le produit attendu 12, repérable par ses propriétés fluorescentes et sa révélation à l'aldéhyde anisique (réactif des sucres) après migration sur couche mince, sont évaporées à sec. La purification du composé est achevée par CLHP sur colonne Nucleosil 5-C18 éluée par un gradient linéaire d'acétonitrile dans l'acétate de triéthylammonium 0,01 M pH 7 en 20 min. Après évaporation des solvants et lyophilisation du résidu, le produit est passé sur résine Dowex 50W échangeuse d'ions NH_4^+ . Après une nouvelle lyophilisation, le composé 12 est obtenu sous forme de poudre jaune (0,55 mg) avec un rendement de 2%.

Méthode B

15 mg de composé 10 (0,009 mmole) et 9 mg de composé 8 (0,015 mmole) sont séchés par coévaporation avec 3 x 1 ml de pyridine anhydre puis dissous dans 1 ml de pyridine. 20 mg de DCC (0,097 mmole) sont alors ajoutés au milieu réactionnel. Au bout d'une nuit sous agitation, à température ambiante, le composé 10 s'est transformé en deux produits dont un seul présente des propriétés fluorescentes. Après addition d'eau et filtration de la DCU, le mélange est évaporé à sec. Les produits réactionnels sont séparés par chromatographie en phase inverse sur colonne Lichroprep RP 18 éluée avec un gradient par palier de méthanol (20 à 80%) dans le BTEA 0,05 M, pH 7. Les fractions contenant le composé fluorescent 11 (élué à 70% en méthanol) sont rassemblées et évaporées à sec; le résidu est lyophilisé. On obtient 2,5 mg de 11 dont la pureté a été évaluée à 85% en CLHP analytique sur Nucleosil 5-C18. 2 mg de composé 11 sont alors détritylés par l'acide acétique à 80% pendant 20 min. L'acide est éliminé par coévaporation avec du toluène. Le résidu est repris par 5 ml de BTEA 0,05 M, pH 7 et la solution est

lavée par l'éther éthylique puis lyophilisée. Le composé 12 est purifié par CLHP comme décrit dans la méthode A; il est passé sur Dowex 50W (forme NH_4^+). On obtient 0,9 mg de 12 (6,5%).

L'identité des produits formés par les deux méthodes a été vérifiée par CLHP analytique dans les conditions décrites pour la CLHP préparative.

UV: le spectre d'absorption de 12 a été enregistré dans un tampon cacodylate de Na 10 mM, NaCl 0,1 M. Les caractéristiques spectrales de 12 dépendent du pH de la solution. pH 6: 271 nm (43000); 307 nm (31300); 314 nm (31900). pH 7,8: 271 nm (46400); 304 nm (30300). Masse: 1524: $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Remerciements:

Nous tenons à remercier le Dr. A. Gouyette (Institut Gustave Roussy) d'avoir caractérisé les composés par spectroscopie de masse. Ce travail a été réalisé grâce à une bourse BDI attribuée à C. Gautier par le CNRS et la Sanofi.

Références

- [1] C. Hélène et G. Lancelot, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 39, 1 (1982).
- [2] M.E. Winkler, K. Mullis, J. Barnett, J. Stroynowski et C. Yanofsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2181 (1982).
- [3] P.S. Miller, K.B. Mc Parland, K. Jayaraman et P.O.P. Ts' O, *Biochemistry*, 20, 1874 (1981).
- [4] P.S. Miller, C.H. Agris, L. Aurelian, K.R. Blake, A. Murakami, M.P. Reddy, S.A. Spitz et P.O.P. Ts' O, *Biochimie*, 67, 769 (1985)
- [5] U. Asseline, N.T. Thuong et C. Hélène, *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 297, 369 (1983)
- [6] U. Asseline, F. Toulmé, N.T. Thuong, M. Delarue, T. Montenay-Garestier et C. Hélène, *Embo J.*, 3, 795 (1984).
- [7] U. Asseline, M. Delarue, G. Lancelot, F. Toulmé, N.T. Thuong, T. Montenay-Garestier et C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3297 (1984)
- [8] U. Asseline, N.T. Thuong et C. Hélène, *J. Biol. Chem.*, 260, 8936 (1985)

- [9] C. Hélène, T. Montenay-Garestier, T. Saison, M. Takasugi, J.J. Toulmé, U. Asseline, G. Lancelot, F. Toulmé et N.T. Thuong, *Biochimie*, **67**, 777 (1985).
- [10] J.J. Toulmé, H.M. Krisch, N. Loreau, N.T. Thuong et C. Hélène, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1227 (1986).
- [11] J.B. Le Pecq, N. Dat Xuong, C. Gosse et C. Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 5078 (1974).
- [12] C. Gautier, F. Morvan, B. Rayner, J.-L. Imbach, T. Huynh-Dinh, J. Igolen, C. Paoletti et J. Paoletti, *Nucl. Acid. Res.*, **15**, 6625 (1987).
- [13] J.C. Catlin et F. Cramer, *J. Org. Chem.*, **38**, 245 (1973).
- [14] K. Itakura, C.P. Bahl, M. Katagiri, J.J. Micknicwicz, R.H. Wightmann et S.A. Narang, *Can. J. Chem.*, **51**, 3649 (1973).
- [15] J. Stawinski, T. Hozumi, S.A. Narang, C.P. Bahl et R. Wu, *Nucl. Acid. Res.*, **4**, 353 (1977).
- [16] R.L. Letsinger et P.S. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3356 (1969).
- [17] A. Kimchi, H. Shure, Y. Lapidot, S. Rapoport, A. Panet et M. Revel, *FEBS Lett.*, **134**, 212 (1981).
- [18] G. Höfle, W. Steglich et H. Vorbüggen, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **17**, 569 (1978).
- [19] C. Auclair et C. Paoletti, *J. Med. Chem.*, **24**, 289 (1981).
- [20] C. Auclair, E. Voisin, H. Banoun, C. Paoletti, J. Bernadou et B. Meunier, *J. Med. Chem.*, **27**, 1161 (1984).
- [21] V.K. Kansal, S. Funakoshi, P. Mangeney, P. Potier, B. Gillet, E. Guittet et J.Y. Lallemand, *Tet. Lett.*, **25**, 2351 (1984).
- [22] V.K. Kansal, R. Sundaramoorthi, B.C. Das et P. Potier, *Tet. Lett.*, **26**, 4933 (1985).
- [23] R. Sundaramoorthi, V.K. Kansal, B.C. Das, et P. Potier, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 371 (1986).
- [24] G.M. Tener, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 159 (1961).
- [25] P.T. Gilham et H.G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6212 (1958).
- [26] A. Gouyette, C. Auclair et C. Paoletti, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **131**, 611 (1985).
- [27] O. Hernandez, S.K. Chaudhary, R.H. Cox et J. Porter, *Tet. Lett.*, **22**, 1491, (1981).
- [28] R.W. Guthrie, A. Brossi, F.A. Mennona, J.G. Mullin, R.W. Kierstead et E. Grünberg, *J. Med. Chem.*, **18**, 755 (1975).

Received January 5, 1988.