

SYNTHESE CHIMIQUE DE NUCLEOTIDES POSSEDANT DES
LIAISONS PHOSPHODIESTERS 2'-5' ET 3'-5' VICINALES

Sophie Huss, Gilles Gosselin et Jean-Louis Imbach*

*Laboratoire de Chimie Bio-Organique, UA 488 du CNRS, Université des
Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 Montpellier Cedex, France.*

Summary. Two branched trinucleotides, consisting of an adenosine linked at 3' to a cytidine and at 2' to a guanosine or to a 2-amino-6-phenylmercapto-purine riboside were synthesized from a common precursor.

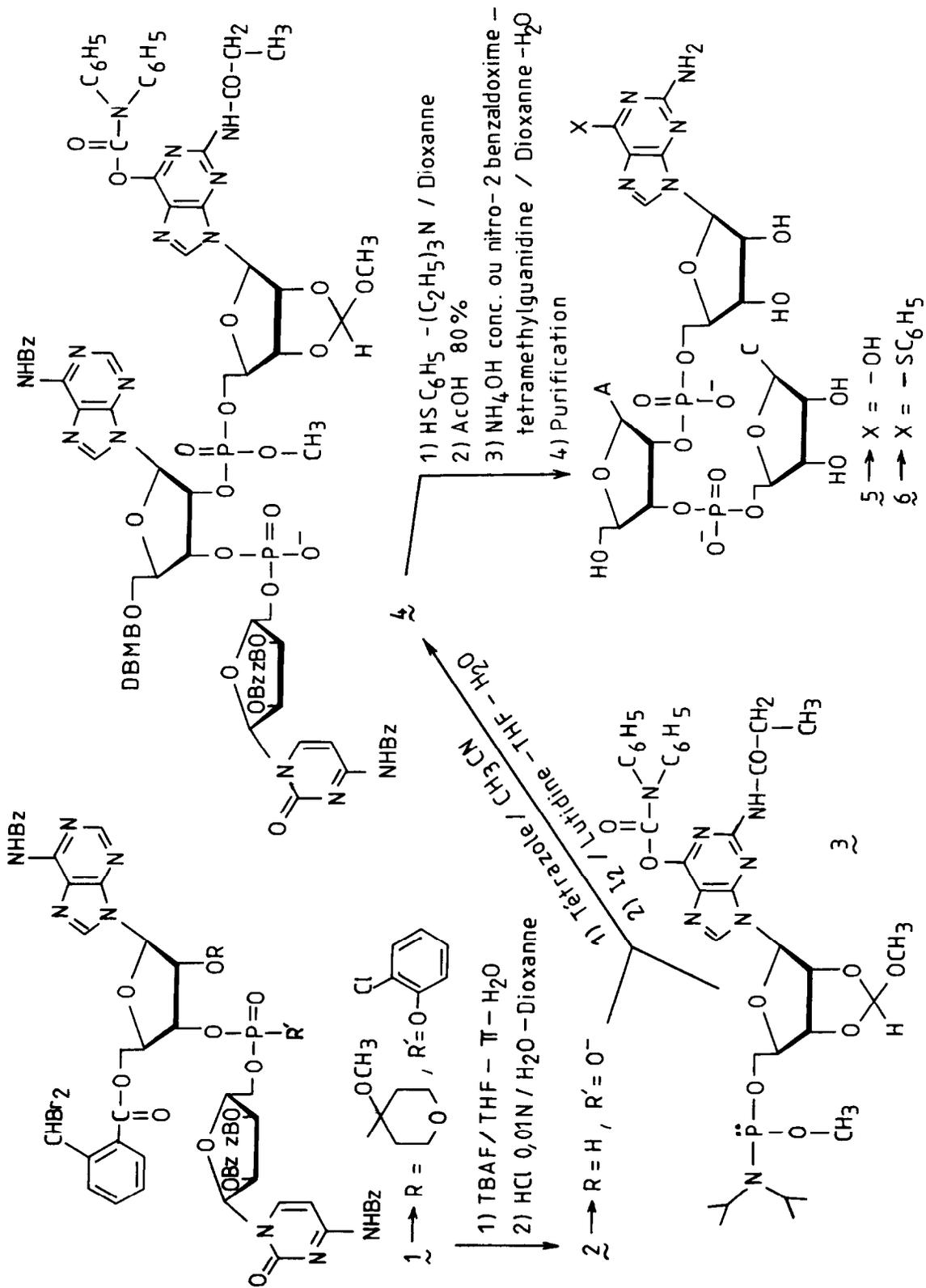
Il est maintenant bien établi qu'au cours de l'épissage des précurseurs des ARN messagers¹, une liaison covalente phosphodiester s'établit entre l'hydroxyle-2' d'une adénosine et le phosphate porté par l'extrémité 5' préalablement libérée de l'intron, généralement celui d'une guanosine. Il en résulte la formation d'une structure branchée en lasso qui est ensuite dégradée pour conduire à un triribonucléotide particulier, tel 5.

Entre la découverte en 1983, par Wallace et Edmonds², des ribonucléotides branchés et l'aboutissement de ce travail, trois manuscrits ont rapporté la synthèse chimique de diverses molécules de ce type^{3,5}; cependant, seul le dernier⁵ décrit leur obtention en quantité notable et avec des rendements raisonnables. Enfin, tout récemment, une communication a été présentée sur le même sujet⁶.

Pour notre part, nous présentons ici une synthèse régiospécifique de deux triribonucléosides diphosphates: le premier, 5, a été trouvé au point de branchement des structures lasso des ARN précurseurs de la globine- β humaine⁷; le second, 6, est un analogue de 5 dont la guanine est modifiée en position 6.

Notre approche, basée sur une stratégie totalement différente des deux premières rapportées^{3,4} mais similaire de la troisième⁵, a impliqué la préparation préalable, selon la méthode au phosphotriester modifiée⁸, du dimère totalement protégé 1⁹. Tous les essais d'élimination sélective dans des conditions acides du groupement méthoxytétrahydropyranylle en 2' de 1 nous ont conduits à des coupures et migrations de la liaison internucléotidique et ce conformément aux résultats de la littérature¹⁰. Par contre, le dimère partiellement déprotégé 2 fut facilement obtenu en traitant dans un premier temps 1 par du fluorure de tétrabutylammonium 0,05M dans un mélange THF-pyridine-eau (8:1:1, v/v/v) durant 14 heures à température ambiante¹¹ et ce afin de former le phosphate diester; puis en éliminant le groupement acido-labile en 2' par de l'HCl 0,01N dans un mélange eau-dioxanne (1:1, v/v) durant 3 heures à température ambiante. Notons que dans ces conditions aucune isomérisation de 3' en 2' ne put être décelée¹².

L'étape suivante consista en une condensation, dans l'acétonitrile et en présence de tétrazole⁵, de 2 avec le synthon phosphoroamidite dérivé de la guanosine 3, suivie d'une oxydation par l'iode de l'atome de phosphore. Le triribonucléotide protégé 4 put ainsi être obtenu avec un rendement satisfaisant¹². Le composé 3 a été préalablement préparé dans l'acétonitrile à partir du nucléoside OH-5' correspondant⁹ et de la bis(diisopropylamino)méthoxyphosphine¹³, en présence de



diisopropylammonium tétrazolide¹⁴. Sa particularité est de posséder l'hydroxyle en 6 protégé par le groupement diphenylcarbamoyle (DPC), le DPC ayant l'avantage de pouvoir être introduit pratiquement quantitativement, d'augmenter la lipophilicité et de pouvoir être facilement détecté sous forme de tache bleu foncé par CCM après chauffage¹⁵.

La déprotection finale a été réalisée en traitant le trinuécléotide 4 successivement et dans l'ordre par : 1) un mélange de thiophénol-triéthylamine-dioxane (1:2:2, v/v/v, 25 ml par mmole de 4 ; 2 heures, température ambiante) afin d'enlever le méthyle du phosphotriester¹⁶ ; à ce stade, une rapide chromatographie sur colonne de silice a permis d'éliminer une grande partie du thiophénol ; 2) l'acide acétique aqueux 80 % (2 heures, température ambiante) afin d'hydrolyser la fonction méthoxyméthylène¹⁷ ; 3) soit l'ammoniaque aqueux 20 % (22 heures, 55°C), soit le *p*-nitrobenzaldoximate de tétraméthylguanidinium 1M dans un mélange dioxane-eau (1:1, v/v ; 22 heures, 55°C) afin d'éliminer tous les groupements baso-labiles restants^{8, 18}. Après extraction avec du chloroforme, une CCM¹⁹ de la phase aqueuse montre dans les deux cas la présence principalement de deux taches correspondant aux composés 5 et 6. Ces derniers ont été isolés par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A25 avec un gradient linéaire d'hydrogénocarbonate de triéthylammonium, pH 7,5 (de 10⁻³ à 0,3M) et leur pureté vérifiée par HPLC⁹. Après transformation sous leur forme de sel de sodium par passage à travers une colonne de résine échangeuse d'ions Dowex 50W (forme Na⁺), leur structure a été confirmée par RMN^{9,20} et par spectrométrie de masse^{9,21}. Ces deux composés 5 et 6 se sont montrés résistants à l'action de la phosphatase alcaline, de la RNase T₂ et de la phosphodiesterase de rate de veau. Par contre, chacun d'eux a été complètement hydrolysé en 16 heures à 37°C par la phosphodiesterase de venin de serpent en leurs unités monomériques correspondantes dans un rapport équimolaire⁹.

Quoique surprenante, l'obtention de 6 peut s'expliquer par une substitution nucléophile du groupement diphenyl carbamate par l'ion thiophénolate. Des expériences sont en cours dans notre Laboratoire pour étudier d'une part la stabilité de ce groupement, d'autre part, la possibilité d'obtenir de nouveaux analogues de 5, modifiés tant au niveau de la position 6 de la guanine que du phosphate internuécléotidique 2'-5'. De plus, une élimination sélective⁸ du groupement *o*-dibromométhylbenzoyle (DBMB) de 4 devrait permettre l'introduction de chaînes oligonuécléotides en position 5'.

L'utilité du composé naturel 5 et de son analogue 6 dans l'étude du mécanisme d'épissage des ARN messagers des eucaryotes est actuellement évaluée par diverses équipes de biologistes de notre Université.

Remerciements. Ce travail a bénéficié du soutien du C.N.R.S. (ARI Chimie-Biologie) auquel nous adressons nos plus vifs remerciements.

Références.

- 1) Pour une revue, voir : R.A. Padgett, P.J. Grabowski, M.M. Konarska, S. Seiler et P.A. Sharp, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 1119 (1986).
- 2) J.C. Wallace et M. Edmonds, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **80**, 950 (1983).
- 3) M. Sekine et T. Hata, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 5813 (1985).
- 4) M.J. Damha, R.T. Pon et K.K. Ogilvie, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 4839 (1985).
- 5) R. Kierzek, D.W. Kopp, M. Edmonds et M.H. Caruthers, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 4751 (1986).
- 6) J.M. Vial, N. Balgobin, A. Nyilas et J. Chattopadhyaya : 7th International Round Table

Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Applications, Sept. 29 - Oct. 3 1986, Konstanz, FRG.

- 7) B. Ruskin, A.R. Krainer, T. Maniatis et M.R. Green, Cell, **38**, 317 (1984).
- 8) a) S.S. Jones, B. Rayner, C.B. Reese, A. Ubasawa et M. Ubasawa, Tetrahedron, **36**, 3075 (1980);
b) J.J. Vasseur, B. Rayner, A. Pompon et J.L. Imbach, Nouv. J. Chim., **5**, 343 (1981).
- 9) S. Huss, G. Gosselin et J.L. Imbach, manuscrit en préparation.
- 10) a) C.B. Reese et P.A. Skone, Nucleic Acids Res., **13**, 5215 (1985);
b) T. Pathak et J. Chattopadhyaya, Acta Chem. Scand., **B39**, 799 (1985).
- 11) a) J.H. van Boom et P.M.J. Burgers, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, **97**, 73 (1978);
b) J.H. van Boom, P.M.J. Burgers, C.H.M. Verdegaal et G. Wille, Tetrahedron, **34**, 1999 (1978);
c) J.A.J. den Hartog, G. Wille et J.H. van Boom, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, **100**, 320 (1981).
- 12) Les différents intermédiaires 1-4 ont été purifiés par chromatographie sur colonne de silice; leur pureté a été vérifiée par CCM et leur structure confirmée par RMN du ^1H et ^{31}P .
- 13) A.D. Barone, J.Y. Tang et M.H. Caruthers, Nucleic Acids Res., **12**, 4051 (1984).
- 14) L.J. McBride, R. Kierzek, S.L. Beaucage et M.H. Caruthers, J. Am. Chem. Soc., **108**, 2040 (1986).
- 15) a) T. Kamimura, M. Tsuchiya, K. Koura, M. Sekine et T. Hata, Tetrahedron Lett., **24**, 2775 (1983); b) T. Kamimura, M. Tsuchiya, K.I. Urakami, K. Koura, M. Sekine, K. Shinozaki, K.I. Miura et T. Hata, J. Am. Chem. Soc., **106**, 4552 (1984).
- 16) a) G.W. Daub et E.E. van Tamelen, J. Am. Chem. Soc., **99**, 3526 (1977);
b) W. Herdering et F. Seela, J. Org. Chem., **50**, 5314 (1985).
- 17) B.E. Griffin, M. Jarman, C.B. Reese et J.E. Sulston, Tetrahedron, **23**, 2301 (1967).
- 18) T.P. Patel, M.A. Chauncey, T.A. Millican, C.C. Bose et M.A.W. Eaton, Nucleic Acids Res., **12**, 6853 (1984).
- 19) Merck Silica Gel 60F₂₅₄ (Art. 5554). Solvant (v/v), NH₄OAc 1M/EtOH (2/8), Rf : 0,15 (5) et 0,35 (6); isopropanol/NH₄OH/H₂O (7/2/1), Rf = 0,17 (5) et 0,43 (6).
- 20) RMN ^1H (D₂O) : les valeurs de δ sont exprimées en ppm par rapport à H₂O fixé à 4,79 ppm ;
5 : 8,31 (s, 1H, H-8(A)), 7,98 (s, 1H, H-2(A)), 7,94 (d, 1H, H-6(C) ; J_{5,6} = 7,5 Hz), 7,81 (s, 1H, H-8(G)), 6,27 (d, 1H, H-1'(A) ; J_{1',2'} = 5,8 Hz), 6,07 (d, 1H, H-5(C)), 6,02 (d, 1H, H-1'(C) ; J_{1',2'} = 4,2 Hz), 5,74 (d, 1H, H-1'(G) ; J_{1',2'} = 4,9 Hz) ; 6 : 8,29 (s, 1H, H-8(A)), 8,05 (s, 1H, H-8(G modifiée)), 7,99 (s, 1H, H-2(A)), 7,92 (d, 1H, H-6(C) ; J_{5,5} = 7,6 Hz), 7,78-7,75 et 7,64-7,62 (2m, 2 et 3H, S-C₆H₅) , 6,26 (d, 1H, H-1'(A) ; J_{1',2'} = 5,2 Hz), 6,03 (d, 1H, H-5(C)), 5,99 (d, 1H, H-1'(C) ; J_{1',2'} = 4,0 Hz), 5,85 (d, 1H, H-1'(G modifiée) ; J_{1',2'} = 4,7 Hz).
- 21) Spectres de masse : FAB < 0 (thioglycérol) , (M-H)⁻ : 6 , calc. = 1008,19, trouvé = 1008,36 ;
FAB > 0 (thioglycérol) , (M+Na)⁺ : 5 , calc. = 940,18 , trouvé = 940,15 . (M-H+2Na)⁺ : 5 ,
calc. = 962,16 , trouvé = 962,25 . Résultats du Dr. A. Gouyette , Villejuif , que nous tenons à remercier .

(Received in France 28 June 1986)