

SYNTHÈSE DU TRIMÈRE DE LA  $\beta$ -D-XYLOFURANNOSYL-9  
ADÉNINE A LIAISONS INTERNUCLÉOTIDIQUES 2'→5'.

G. Gosselin et J.L. Imbach.

Laboratoire de Chimie Bio-Organique et E.R.A. n° 195 du C.N.R.S.  
Université des Sciences et Techniques du Languedoc,  
Place E. Bataillon, 34060 Montpellier (France).

*Abstract* : The trimeric xylo-adenylyl(2'→5')-xylo-adenylyl-(2'→5')-xyloadenosine 1 was synthesized by the modified phosphotriester approach, followed by deblocking the fully, protected intermediates.

L'activité antivirale et antitumorale des interférons a été directement corrélée à la production<sup>1</sup> d'oligonucléotides de structure inhabituelle  $\text{ppp}(\text{A}_2'\text{p})_n\text{A}^*$  ; cependant, ces oligomères sont rapidement dégradés *in situ* sous l'action d'une phosphodiesterase<sup>2</sup>.

Néanmoins, les propriétés biologiques de ces oligonucléotides n'apparaissent qu'à partir du trimère ( $n \geq 2$ ), qui constitue par ailleurs l'une des entités les plus actives<sup>3</sup>. De plus, alors que le trimère synthétique est trop fortement chargé pour pouvoir pénétrer dans les cellules, le coeur,  $\text{A}_2'\text{p}_5'\text{A}_2'\text{p}_5'\text{A}^*$ , quoiqu'inactif en milieu acellulaire, présente le même type d'activité dans des cultures de cellules entières, ce qui suggère qu'il est phosphorylé à l'intérieur de ces dernières<sup>3</sup>.

Ainsi une modification structurale portant sur les hydroxyles 2' ou 3' du coeur pourrait, tout en conservant une activité de type interféron, conduire à une résistance à la phosphodiesterase, d'où un degré de protection supérieur et une augmentation de la durée d'activité biologique de ces oligonucléotides ; c'est dans cette optique que, tout récemment, divers analogues structuraux de ce coeur ont été synthétisés, mais uniquement en série ribose (0-méthyl-3', désoxy-3' etc)<sup>4-7</sup>.

Dans ce travail, nous avons réalisé la synthèse chimique du xylo-adénylyl-(2'→5')-xyloadénylyl-(2'→5')-xyloadénosine 1, analogue qui ne se distingue du 2→5  $\text{A}^*$  naturel que par l'inversion des hydroxyles 3'.

Pour être certains de n'introduire que des liaisons internucléotidiques de type 2'→5', nous avons mis en oeuvre une stratégie fondée sur l'utilisation de la méthode aux phosphotriesters, originellement décrite par Narang et coll.<sup>8</sup> et déjà utilisée dans notre laboratoire<sup>9</sup>. Les deux synthons choisis 8 et 10 possèdent deux types de protection différents: monométhoxytrityle (acido-labile) et/ou benzoyle (baso-labile) ; l'emploi d'un groupement protecteur acylé en 3' nous a en effet semblé opportun en série xylose, puisque l'orientation *trans* des hydroxyles secondaires exclut la migration d'un tel groupement de 3' en 2' et *vice versa*. Ainsi, une condensation de 8 et 10 conduit, sans ambiguïté, au dimère 11 qui, après déprotection sélective en 5', est à nouveau condensé avec 8 afin d'obtenir le produit

désiré. Le composé de départ 7 a été synthétisé en cinq étapes à partir de la di-0-benzoyl-3',5'- $\beta$ -D-xylofurannosyl-9 adénine 2 et le synthon 10 en deux étapes supplémentaires à partir de 7, avec dans chaque cas des rendements finaux satisfaisants<sup>10</sup>.

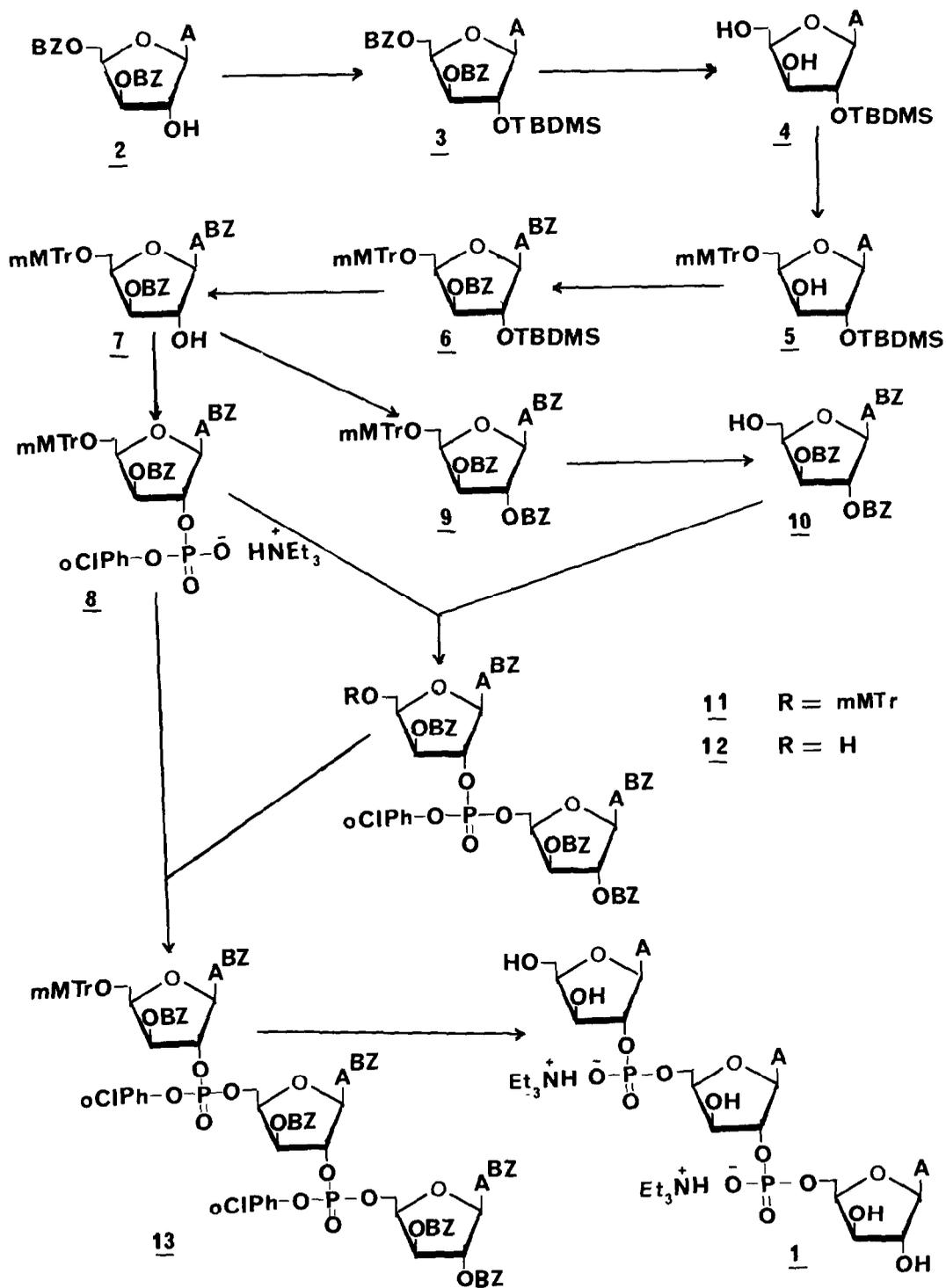
La première étape de la synthèse oligonucléotidique a consisté à former le synthon arylphosphate-2' 8 à partir du dérivé 7, par réaction de ce dernier avec un excès d'*o*-chlorophénylphosphorodi-(triazol-1,2,4-ide)<sup>11-12</sup> dans un mélange acétonitrile-pyridine ; on traite ensuite avec de la triéthylamine aqueuse. Le phosphodiester 8 a été isolé sous forme de sel de triéthylammonium avec un rendement pratiquement quantitatif par extraction avec du chloroforme et précipitation dans l'éther de pétrole, Rf = 0, solvant A ; Rf = 0,37, solvant B<sup>13</sup>. Dans la seconde étape, qui consiste à faire réagir l'intermédiaire 8 sur la fonction hydroxyl-5' du synthon 10, nous avons choisi comme agent d'activation le mésitylènesulfonyl-1 nitro-3 triazole-1,2,4 (MSNT)<sup>14-15</sup> en raison de sa stabilité et de son efficacité. Ainsi, une solution dans la pyridine de 8 et de 10 (ce dernier en léger excès) est traitée par 2,9 éq. de MSNT durant 20 mn à température ambiante ; le mélange réactionnel est ensuite versé dans une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> et extrait avec du chloroforme. Le dinucléoside monophosphate 11 obtenu est directement traité par de l'acide *p*-toluènesulfonique 2 % dans un mélange CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 7/3 (V/V), pour conduire au dimère détritylé 12 ; ce dernier est isolé avec un rendement de 70 % par rapport à 10, après neutralisation, extraction, purification<sup>16</sup> et précipitation dans l'éther de pétrole, Rf = 0,24 et 0,17, (deux diastéréoisomères), solvant A<sup>13</sup>.

Une dernière condensation entre ce dimère 12 possédant l'hydroxyle-5' libre et le phosphodiester 8, suivi d'un traitement approprié et d'une purification<sup>16</sup>, le tout dans des conditions similaires à celles décrites précédemment, permet d'obtenir le trimère totalement bloqué 13 sous forme d'une poudre blanche, avec un rendement de 75 %, Rf = 0,42 ; 0,37 ; 0,33 et 0,28 (quatre diastéréoisomères), solvant A<sup>13</sup>.

Le coeur 1 a été finalement obtenu en traitant le trimère 13 successivement et dans l'ordre par : 1) le *p*-nitrobenzaldoximate de tétraméthylguanidinium<sup>14-15</sup> afin d'enlever les groupements *o*-chlorophényles ; 2) l'ammoniaque aqueux pour hydrolyser les groupements benzoyles ; 3) l'acide acétique 80 % afin d'éliminer le monométhoxytrityle. Une purification par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A25 avec un gradient linéaire d'hydrogencarbonate de triéthylammonium, pH = 7,5 (2.10<sup>-3</sup> M à 0,5 M) permet d'obtenir le coeur désiré 1 avec un rendement supérieur à 80 %. Sa pureté a été vérifiée par HPLC<sup>17</sup> et CCM<sup>13</sup>, Rf = 0,28, solvant C ; 0,38, solvant D ; 0,40, solvant E.

Le coeur 1 s'est révélé totalement résistant à la phosphodiesterase de rate de veau ; il est par contre complètement hydrolysé en 16 h à 37°C par la phosphodiesterase de venin de *Crotalus durissus terrificus* en  $\beta$ -D-xylofurannosyl-9 adénine et en son nucléoside 5' monophosphate dans le rapport 1/2 (HPLC<sup>17</sup>).

Des études physico-chimiques et biologiques plus approfondies de ce composé sont en cours au Laboratoire de Biochimie des Protéines du Professeur B. Lebleu, à l'U.S.T.L., et seront publiées ultérieurement.



## REFERENCES ET NOTES

- \* Abréviations :  $(A_2'p)_n 5'A$  = oligomères de l'acide adénylique ne présentant que des liaisons phosphodiester 2'→5' et possédant un groupement triphosphate à l'extrémité 5'.
1. M.J. Clemens, *Cell* 13, 555 (1978).
  2. A. Schmidt, Y. Cherhajovsky, L. Shulman, P. Federman, H. Berissi et M. Revel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 4788 (1979).
  3. E.M. Martin, N.J.M. Birdsall, R.E. Brown et I.M. Kerr, *Eur. J. Biochem.* 95, 295 (1979).
  4. R. Charubala et W. Pfeleiderer, *Tetrahedron Lett.*, 4077 (1980).
  5. J. Engels, *Tetrahedron Lett.*, 4339 (1980).
  6. J.A.J. den Hartog, R.A. Wijnands et J.H. van Boom, *Nucleic Acid Res.* 7, 157 (1980).
  7. C. Baglioni, S. D'Alessandro, T.W. Nilsen, J.A.J. den Hartog, R. Crea et J.H. van Boom, *J. Biol. Chem.* 256, 3253 (1981).
  8. K. Itakura, N. Katagiri, C.P. Bahl, R.H. Wightman et S.A. Narang, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 7327 (1975).
  9. J.J. Vasseur, B. Rayner, A. Pompon et J.L. Imbach, *Nouveau Journal de Chimie*, 5, 343 (1981)
  10. G. Gosselin et J.L. Imbach, en cours de publication.
  11. J.B. Chattopadhyaya et C.B. Reese, *Tetrahedron Lett.*, 5059 (1979).
  12. J.B. Chattopadhyaya et C.B. Reese, *Nucleic Acid Res.* 8, 2039 (1980).
  13. Merck Silica Gel 60F<sub>254</sub> (Art. 5554). Solvants (V/V) = A : CHCl<sub>3</sub>/MeOH (96/4) ; B : CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8/2) ; C : NH<sub>4</sub>OAc 1M/EtOH (2/8) ; D et E : isopropanol/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O respectivement (7/2/1) et (7/1/2).
  14. C.B. Reese, R.C. Titmus et L. Yau, *Tetrahedron Lett.*, 2727 (1978).
  15. S.S. Jones, B. Rayner, C.B. Reese, A. Ubasawa et M. Ubasawa, *Tetrahedron*, 36, 3075 (1980).
  16. Par chromatographie sur colonne de gel de silice Merck, Kieselgel 60H (Art. 7736), sous faible pression. Solvants (V/V) = CHCl<sub>3</sub>/MeOH : (97/3) pour 12 et (985/15) pour 13.
  17. Colonne analytique Waters  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> ; gradient d'élution préparé conformément à la référence 18.
  18. G.D. McFarland et P.N. Borer, *Nucleic Acid Res.* 7, 1067 (1979).

(Received in France 25 June 1981)