

SYNTHESE REGIOSPECIFIQUE D'UN DINUCLEOSIDE PONTE :  
(D<sup>6</sup>-DESOXYGUANOSINYL)-1 (N<sup>4</sup>-DESOXYCYTIDYL)-2 ETHANE

Annie-Françoise Maggio, Marc Lucas, Jean-Louis Barascut et Jean-Louis Imbach\*

Laboratoire de Chimie Bio-Organique, ERA n° 948 du CNRS, Université des Sciences  
et Techniques du Languedoc, Place E.-Bataillon, 34060 Montpellier Cedex (France)

*Summary* : Appropriate protected deoxyguanosine and deoxyuridine derivatives, respectively activated at O<sup>6</sup> and O<sup>4</sup> positions by the 3-nitro 1,2,4-triazol 1-yl group, were reacted with ethylene glycol, ethylenediamine or ethanolamine to give monoalkylated nucleosides or cross-linked dimers or cross-linked dinucleosides.

L'activité antitumorale des agents alkylants bifonctionnels, comme par exemple les N,N'-bis(halo-2 éthyl) N-nitrosourées, est liée à leur capacité à provoquer des pontages intra ou inter-brins dans l'ADN (1-3). Ainsi, il a été postulé que la formation de pontages inter-brins était principalement responsable de la cytotoxicité observée sur des cellules cancéreuses par suite d'une déficience du système de réparation enzymatique (4). Divers auteurs (5) ont émis l'hypothèse que ce pontage (pont éthylène-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) reliait l'atome d'oxygène O<sup>6</sup> de la déoxyguanosine, l'un des sites les plus nucléophiles de l'ADN (6), à l'atome d'azote N<sup>4</sup> de la déoxycytidine. Ludlum et coll.(7,8) ont récemment isolé, lors de l'incubation d'ADN de thymus de veau avec la BCNU, un dinucléoside ponté (10 unités A<sub>254</sub>) auquel ils ont attribué une structure où les positions N<sup>1</sup> de dG et N<sup>3</sup> de dC seraient impliquées dans le pontage. Cependant, aucune approche chimique ne semble avoir été rapportée à ce jour pour ce type de composé. Pour cette raison et dans le cadre d'un projet plus général sur le mode d'action des nitrosourées, nous avons été amenés à synthétiser le composé modèle 1 (Fig. 1).

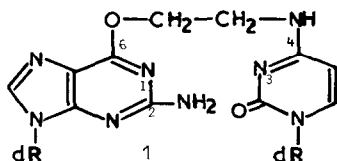


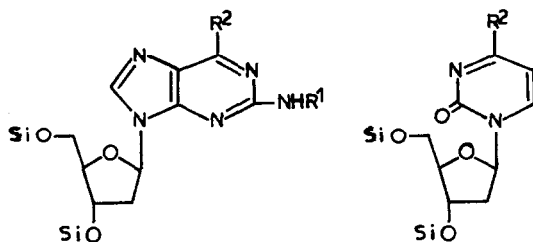
Fig. 1

La stratégie globale que nous avons envisagée pour créer de façon régiospécifique un pont -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- entre dG et dC fut d'activer les positions 6 de dG et 4 de dU, puis de les coupler par l'intermédiaire de l'aminoéthanol, par deux réactions successives de substitution nucléophile. Une telle approche implique au préalable de protéger sélectivement les autres centres nucléophiles des deux nucléosides de départ (Fig. 2). Pour ce faire, les fonctions alcools de ces composés ont été bloquées par un groupement tertibutyldiméthylsilyle (9) et la fonction amine exocyclique de dG par un groupe trityle ou monométhoxytrityle (10-13). L'activation des positions 6 de dG et 4 de dU peut être *a priori* envisagée selon diverses méthodes (10,12-18).

Nous avons choisi le groupement nitro-3 triazol-1,2,4 yl-1 déjà utilisé en série

nucléosidique (19-24). Les nucléosides di-O-TBDMS-3',5' 2 (9) et 8 sont obtenus respectivement à partir de la désoxyguanosine et de la désoxyuridine par réaction avec le chlorure de tertibutyl-diméthylsilyle dans le DMF, en présence d'imidazole, ou la pyridine en présence de DMAP.

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Rdt %
2 H	OH	79
3 MMTr	OH	96
4 Tr	OH	81
5 MMTr	NO <sub>2</sub> Tri	11
6 Tr	NO <sub>2</sub> Tri	49
7 H	NO <sub>2</sub> Tri	



R <sup>2</sup>	Rdt %
8 OH	84
9 NO <sub>2</sub> Tri	55
10 OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	66
11 NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	96
12 NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> R <sup>4</sup>	59

Fig. 2 - R<sup>4</sup>=(di-O-TBDMS-3',5' désoxycytidyl)-4

La protection de la fonction amine exocyclique de 2 par les chlorures de monométhoxytrityle et de trityle est effectuée dans la pyridine en présence de DMAP (1 hr à 80°C dans le cas du trityle) pour conduire aux dérivés 3 et 4 avec des rendements respectifs de 96 et 81 %. L'introduction du groupement nitrotriazolyle est réalisée à partir d'o-chlorophénylphosphorodichloridate et de nitrotriazole (21) dans la pyridine anhydre. Contrairement aux résultats de la littérature pour ce type de réaction, les rendements que nous avons obtenus sont faibles : 11, 49 et 55 % pour 5, 6 et 9 respectivement. Le mauvais rendement obtenu pour 5 est imputable à une détritylation partielle que nous avons observée et évaluée par <sup>1</sup>H-rmn (45 %) et qui conduit au composé 7.

Il nous restait à fixer le bras fonctionnalisé -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH en position 4 du dérivé 8. Si, *a priori*, la substitution d'un groupe nitrotriazolyle par des amines est bien connue (20-24), il n'en est pas de même pour les alcools, si ce n'est un exemple rapporté par Sung (23) dans le cas du méthanol. Ainsi, pour accéder à la N<sup>4</sup>-hydroxyéthyl-désoxycytidine 11, il nous fallait utiliser

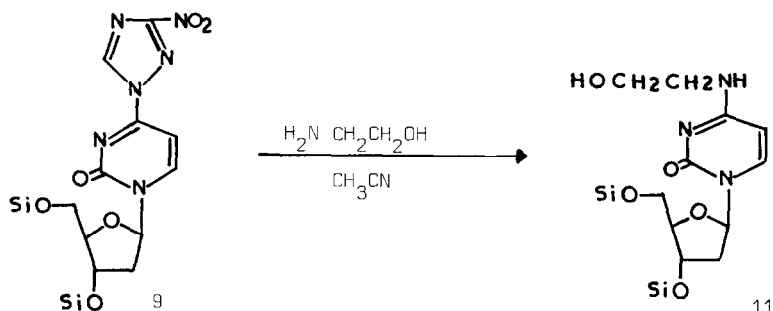


Fig. 3

l'éthanolamine, réactif nucléophile bifonctionnel susceptible de réagir par l'une ou l'autre de ses extrémités sur le dérivé 9. Afin d'éviter une étape de protection - déprotection de la fonction alcool de l'éthanolamine, nous avons testé tout d'abord la réactivité de 9 vis-à-vis de l'éthylène glycol. Seules des conditions opératoires particulières (1,1 éq. DBU par éq. de glycol dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) nous ont permis d'isoler le composé monoalkylé 10 (66 %) alors que l'éthylène-diamine réagit rapidement dans l'acétonitrile, en l'absence de DBU, pour conduire au dimère ponté 12 (59 %).

Ainsi, en utilisant à partir de l'éthanolamine et de 9 des conditions expérimentales iden-

tiques à celles ayant conduit à 12, nous avons obtenu la désoxycytidine monoalkylée 11 avec 96 % de rendement (Fig. 3). Les spectres u.v. et de  $^1\text{H-rmn}$  (25) de ces composés confirment sans ambiguïté les structures proposées. Les dinucléosides protégés 13 et 14 ont ensuite été obtenus par couplage de 11 avec respectivement 5 et 6, dans les conditions opératoires utilisées pour 10 (Fig. 4).

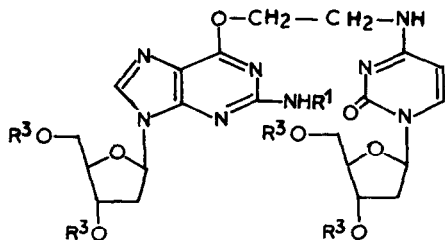


Fig. 4

	R <sup>1</sup>	R <sup>3</sup>	Rdt %
13	MMTr	Si	44
14	Tr	Si	52
15	Tr	H	60
1	H	H	25

La coupure des éthers de tertibutyldiméthylsilyle est réalisée avec le TBAF dans le THF anhydre pour conduire à 15 et ce dernier est détritilé par l'acide acétique 80 % dans le mélange dioxane/eau (4/1 v/v) (27) Le dinucléoside ponté déprotégé 1 ainsi obtenu avec un rendement de 25 % a été caractérisé par spectrométrie de masse,  $^1\text{H-rmn}$  à haut champ et u.v. (25).

Nous avons donc montré dans ce travail qu'il était possible, en utilisant une stratégie convenablement choisie, de parvenir pour la première fois par voie chimique au dinucléoside dG(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>dC. Cette approche ouvre la voie à l'obtention de divers autres dinucléosides pontés pouvant résulter de l'action des N,N'-bis(halo-2 éthyl) N-nitrosourées sur les différents sites nucléophiles de l'ADN.

**Remerciements :** Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien de l'Association de la Recherche contre le Cancer (Contrat "Interactions de l'ADN avec les drogues anticancéreuses").

#### Références et notes :

Abréviations : BCNU, N,N'-bis(chloro-2 éthyl) N-nitrosourée ; DBU, diaza-1,8 bicyclo (5.4.0) undecène-7 ; TBAF, fluorure de tétrabutylammonium ; dG, désoxyguanosine ; dC, désoxycytidine ; dU, désoxyuridine ; dR, désoxyribose ; Si-TBDMS, tertibutyldiméthylsilyle ; MMTr, monométhoxytrityle ; Tr, trityle ; NO<sub>2</sub>Tri, nitro-3 triazol-1,2,4 yl-1.

1. D.B. Ludlum et W.P. Tong dans "Nitrosoureas in Cancer Treatment" (Eds. B. Serrou, P.S. Schein et J.L. Imbach), Elsevier/Hollande, Amsterdam, 1981, p. 21.
2. K.W. Kohn, L.C. Erickson et G. Laurent, dans "Nitrosoureas in Cancer Treatment" (Eds. B. Serrou, P.S. Schein et J.L. Imbach), Elsevier/Hollande, Amsterdam, 1981, p. 33.
3. J.W. Lown, L.W. McLaughlin et Y.M. Chang, Bioorg. Chem., 1978, 7, 97.
4. R.S. Day III, C.H.J. Ziolkowski, D.A. Scudiero, S.A. Meyer, A.S. Lubiniecki, A.J. Girardi, S.M. Galloway et G.D. Bynum, Nature, 1980, 288, 724.
5. K.W. Kohn, L.C. Erickson, G. Laurent, J. Ducore, N. Sharkey et R.A. Ewig dans "Nitrosoureas Current Status and New Developments" A.W. Prestako Ed., Academic Press, New York, 1981, p. 69.

6. Pour une revue récente sur l'alkylation de l'ADN, voir : K. Hemminki, Arch. Toxicol., 1983, 52, 249.
7. W.P. Tong, M.C. Kirk et D.B. Ludlum, Cancer Res., 1982, 42, 3102.
8. W.P. Tong, M.C. Kirk et D.B. Ludlum, Biochem. Pharmac., 1983, 32, 2011.
9. K.K. Ogilvie, A.L. Schiffman et C.L. Penney, Can. J. Chem., 1979, 57, 2230.
10. H.P. Daskalov, M. Sekine et T. Hata, Tetrahedron Lett., 1980, 21, 3899.
11. S. Honda, K. Uragami, K. Koura, J. Matsuzaki, T. Kamimura, T. Masegi, M. Sekine et T. Hata, Nucleic Acids Res., Symposium Series n° 10, 1981, 183.
12. H.P. Daskalov, M. Sekine et T. Hata, Bull. Chem. Soc. Jpn, 1981, 54, 3076.
13. T. Hata, N. Gokita, N. Sakairi, K. Yamaguchi, M. Sekine et Y. Ishido, Bull. Chem. Soc. Jpn, 1982, 55, 2949.
14. P.K. Bridson, W. Markiewicz et C.B. Reese, J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1977, 447.
15. P.K. Bridson, W. Markiewicz et C.B. Reese, J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1977, 791.
16. B.L. Gaffney et R.A. Jones, Tetrahedron Lett., 1982, 23, 2253.
17. B.L. Gaffney et R.A. Jones, Tetrahedron Lett., 1982, 23, 2257.
18. H. Vorbruggen, Angew. Chem. Int. Ed., 1972, 11, 304.
19. C.B. Reese et A. Ubasawa, Tetrahedron Lett., 1980, 21, 2265.
20. C.B. Reese et A. Ubasawa, Nucleic Acids Res., Symposium Series n° 7, 1980, 5.
21. K.J. Divakar et C.B. Reese, J. Chem. Soc. Perkin I, 1982, 1171.
22. W.L. Sung, Nucleic Acids Res., 1981, 9, 6139.
23. W.L. Sung, J. Org. Chem., 1982, 47, 3623.
24. Tai-Shun Lin, You-Song Gao et W.R. Mancini, J. Med. Chem., 1983, 26, 1691.
25. 11  $\tau$ nm ( $^1\text{H}$ , 60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.03 (6H, s,  $2\text{CH}_3\text{Si}$ ), 0.06 (6H, s,  $2\text{CH}_3\text{Si}$ ), 0.86 (9H, s, tBuSi), 0.9 (9H, s, tBuSi), 2.16 (2H, m, H-2'2"), 3.63 (7H, m, H-4'5'5",  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.36 (1H, m, H-3'), 4.66 (1H, s, OH), 5.8 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-5), 6.25 (1H, t, J = 5.6 Hz, H-1'), 7.76 (2H, m, H-6, NH) ; uv (EtOH 95)  $\lambda$  max 273 ( $\epsilon$  9.579).
- 12  $\tau$ nm ( $^1\text{H}$ , 90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.01 (24H, s,  $8\text{CH}_3\text{Si}$ ), 0.82 (36H, s, 4tBuSi), 2.16 (4H, m, 2H-2'2"), 3.65 (10H, m, 2(H-4'5'5"),  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 4.36 (2H, m, 2H-3'), 5.75 (2H, d, J = 7.5 Hz, 2H-5), 6.32 (2H, t, J = 6Hz, 2H-1'), 7.78 (2H, d, J = 7.5 Hz, 2H-6), 8.55 (2H, s, 2NH) ; uv (EtOH 95)  $\lambda$  max 275 ( $\epsilon$  21.109)  $\lambda$  min 238 ( $\epsilon$  14.894).
- 10  $\tau$ nm ( $^1\text{H}$ , 90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.03 (6H, s,  $2\text{CH}_3\text{Si}$ ), 0.01 (6H, s,  $2\text{CH}_3\text{Si}$ ), 0.78 (9H, s, tBuSi) 0.83 (9H, s, tBuSi), 2.23 (2H, m, H-2'2"), 3.06 (1H, s, OH), 3.85 (5H, m, H-4'5'5",  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 4.42 (3H, m, H-3',  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.07 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-5), 6.23 (1H, t, J = 6 Hz, H-1'), 8.26 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-6) ; uv (EtOH 95)  $\lambda$  max 275 ( $\epsilon$  5.518)  $\lambda$  min 240 ( $\epsilon$  1.116).
- 1  $\tau$ nm ( $^1\text{H}$ , 200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$   $\delta_{\text{DOH}} = 4.79$  ppm)  $\delta$  2.34 (2H, m, H-2'2"y), 2.60 (2H, m, H-2'2"x), 3.87 (6H, m, 2(H-4'5'5"),  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.15 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.48 (2H, m, 2H-3'), 5.96 (1H, d, J = 7.32 Hz, H-5), 6.26 (1H, t, J = 6.47 Hz, H-1'y), 6.38 (1H, t, J = 6.93 Hz, H-1'x), 7.70 (1H, d, J = 7.32 Hz, H-6), 8.1 (1H, s, H-8) ; uv ( $\text{H}_2\text{O}$ )  $\lambda$  max 275,245 ( $\epsilon$  11.525, 10.400)  $\lambda$  min 258,227 ( $\epsilon$  8.700, 8.445) HCl 0,1N  $\lambda$  max 283, ep. 240  $\lambda$  min 254 KOH 0,1N  $\lambda$  max 275,244  $\lambda$  min 258,227.

(Received in France 29 March 1984)