



Doctoral Thesis

## Dimethylsulfon-verbrückte Oligoribonucleotide

**Author(s):**

Richert, Clemens

**Publication Date:**

1994

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001373882> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 10895

**Dimethylensulfon-verbrückte Oligoribonucleotide**

Abhandlung  
zur Erlangung des Titels  
Doktor der Naturwissenschaften  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von

Clemens Richert

Dipl. Chem. Universität zu Köln  
Dr. rer. hum. biol. Ludwigs-Maximilians-Universität München

angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. S. A. Benner, Referent  
Prof. Dr. F. Diederich, Coreferent

Zürich 1994

## Zusammenfassung

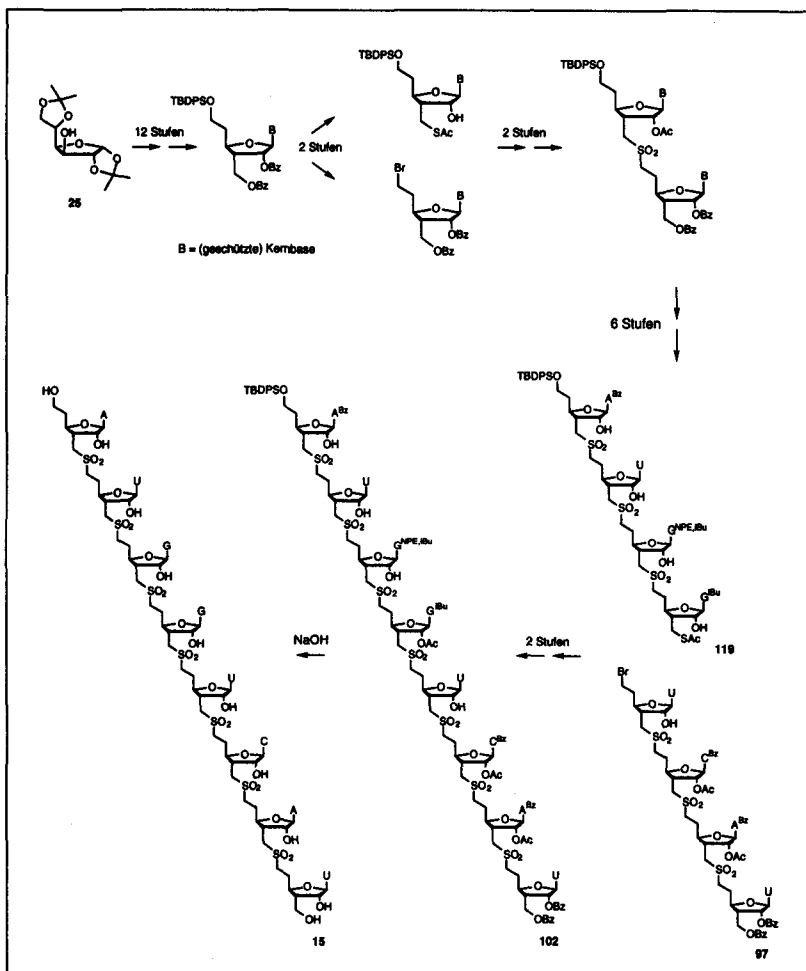
Die vorliegende Arbeit berichtet über die erste Methode, mit der nicht-ionische, basenstabile und isomerenreine oligomere Ribonucleotid-Analoga synthetisiert werden können. In diesen RNA Analoga sind die Phosphodiester-Verbrückungen durch Dimethylsulfon-Einheiten ersetzt.

Die Syntheseroute, die in dieser Arbeit entwickelt wurde, beginnt mit Diacetonglucose, die in 11 Stufen und 14% Ausbeute in ein geschütztes 5-Deoxy-3-hydroxymethyl-1-methyl-allofuranosid umgewandelt wird. Aus diesem Glykosid und  $\text{NH}_2$ -Acyl-geschützten Derivaten käuflicher Kernbasen werden unter modifizierten Vorbrücken-Bedingungen 3',5'-Bishomo- $\beta$ -ribonucleoside hergestellt. Diese Monomer-Bausteine werden, bei Purinen als reine  $\text{N}^9$ -Isomere, im Gramm-Maßstab zugänglich. Nach Entschützung der terminalen Alkohol-Funktionen werden die Nucleoside in guten Ausbeuten in 3"-Thioester oder 6'-Bromide umgewandelt.

Die Monomere können zu Oligoribonucleotid-Analoga beliebiger Basensequenz zusammengefügt werden. Ein Synthesesyklus der Oligomer-Herstellung beinhaltet eine Kopplung unter basischen Bedingungen, eine Oxidation des gebildeten Thioethers zu einem Sulfon, Hydroxyl-Entschützung und Aktivierung des endständigen Alkohols. Bei der Kopplungsreaktion wird das jeweilige Thiol durch Acetylwanderung zur benachbarten 2' OH-Gruppe *in situ* generiert. Dadurch wird die konkurrierende Disulfid-Bildung weitgehend unterdrückt und im gleichen Schritt die Alkoholfunktion geschützt. Für die Umfunktionalisierung der terminalen Hydroxyl-Funktionen werden regioselektive Reaktionen beschrieben. Sowohl die Bromierung mit  $\text{CBr}_4$  und tertiärem Phosphan als auch die Mitsunobu-Reaktion mit Thioessigsäure wandeln die primären Zentren in Gegenwart von freien sekundären Funktionen um. Die 2'-OH-Gruppen müssen deshalb nicht separat geschützt werden. Die in dieser Arbeit entwickelte Oligomer-Synthesestrategie erlaubt die Verwendung von ausschließlich basenlabilen Schutzgruppen. Dies sind bei den endständigen Alkoholen Butyldiphenylsilyl- und Benzoyl-Gruppen. Die Vollentschützung der Oligoribonucleotid-Analoga wird in einem Schritt mit Natronlauge bewirkt. Es werden auch Reaktionen zur Anbringung eines Biman-Fluoreszenzmarkers an die 6'-Position und zur Herstellung einer 3"-Sulfonsäure beschrieben.

Mit der entwickelten Synthesemethode wurde ein Oktamer der Sequenz 5'-AUGGUCAU-3' synthetisiert. Die Synthese erfolgte in 25 Stufen, wobei alle Reaktionen in Lösung durchgeführt wurden. Die Monomere wurden zu Dimeren und diese anschließend zu Tetrameren gekoppelt. Zwei Tetramere wurden dann zum Oktamer vereinigt. Das GG-Dimer entstammte einer

anderen Arbeit (Roughton, 1994). Die folgende Abbildung zeigt das Zielmolekül dieser Arbeit und ausgewählte Vorgänger der Synthese.



Alle isolierten Intermediate und das Zielmolekül wurden mittels MS, NMR und UV-Spektroskopie charakterisiert. Dabei zeigten einige teilgeschützte Sulfon-Oligomere die Fähigkeit, in halogenierten Kohlenwasserstoffen durch intermolekulare Wasserstoffbrücken Assoziate aufzubauen. Diese bestanden zumeist aus Aggregaten, ein  $UC^{Bz}$ -Dimer bildete jedoch in  $CDCl_3$  eine geordnete Struktur, die mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen wurde.

Die nicht-ionischen RNA-Analoga erwiesen sich nach der Vollentschützung als chemisch und physikalisch hochstabil. Eine vorläufige Konformations-Analyse wurde an einem UCAU-Tetramer mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie durchgeführt. Dieses RNA-Analogon zeigt danach, ebenso wie natürliche RNA, ein 3'-endo "puckering" des Ribose-Ringes, das die Methylengruppen des Rückgrates in pseudoequatoriale Lage bringt. Die Ausrichtung der 3'-3" und 4'-5' Bindungen scheint bevorzugt trans zu sein. Die Kernbasen sind vorwiegend in der anti-Konformation, die für die Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaaren notwendig ist.

Die Löslichkeit der AUGGUCAU-Oktamers in Wasser betrug  $\geq 5 \mu\text{M}$ . Mit dem beschriebenen Syntheseverfahren eröffnet sich die Möglichkeit zur biologischen Untersuchung von Molekülen, die potentielle "Antisense"-Agentien und biochemische Werkzeuge darstellen.

## Summary

This dissertation reports the first method for the synthesis of fully uncharged, base-stabile, stereoregular oligomeric ribonucleotide analogs. In these RNA analogs, the phosphodiester-moieties are replaced by dimethylenesulfone units.

The synthetic route developed in this work starts from diacetoneglucose, which is transformed to a protected 5-deoxy-3-hydroxymethyl-1-methyl-allofuranoside in 11 steps in 14% overall yield. 3',5'-Bishomo- $\beta$ -ribonucleosides are prepared from this glycoside and  $\text{NH}_2$ -acyl-protected derivatives of commercially available nucleobases using modified Vorbrüggen conditions. These monomeric building blocks are accessible on gram scales, and pure  $\text{N}^9$ -isomers of purines are obtained. Following terminal deprotection, the nucleosides are converted either to 3''-thioesters or to 6'-bromides in high yields.

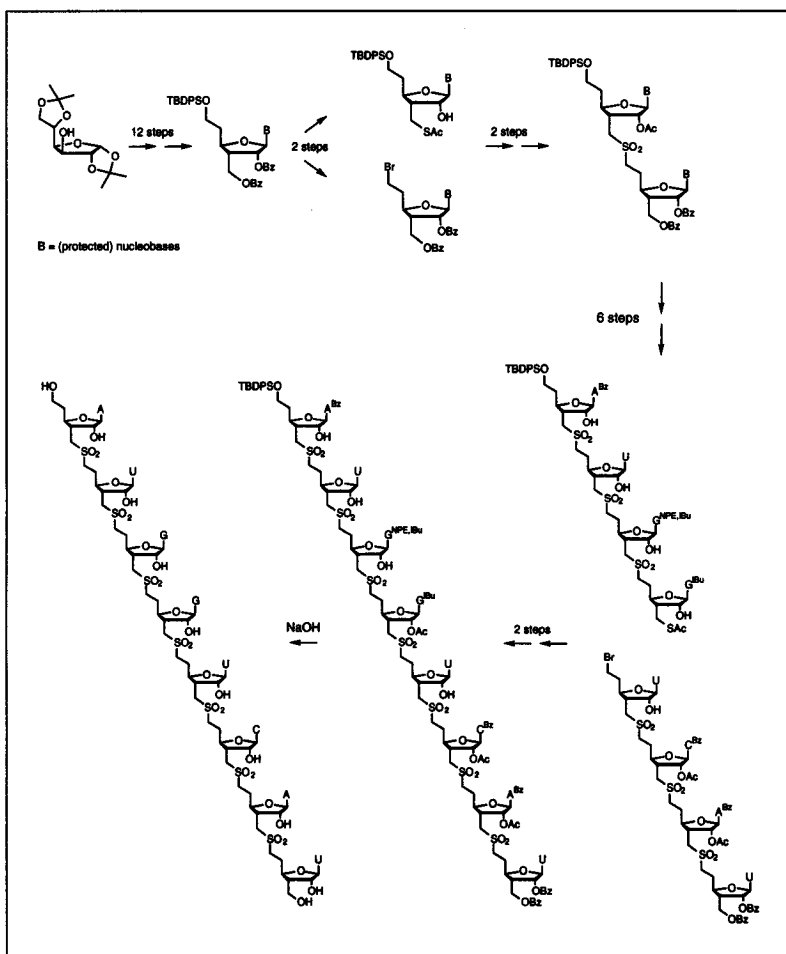
Oligoribonucleotide analogs can be assembled from the monomers in any chosen sequence. The synthetic cycle for oligomer preparation proceeds via coupling under basic conditions, oxidation of the newly formed thioether to a sulfone, hydroxyl deblocking and terminal activation. For the coupling reaction, thiols are liberated *in situ* by acetyl migration to the neighboring 2'-hydroxyl. This reduces possible disulfide formation and protects the OH-function in the same step. For the activation of deprotected terminal hydroxyl groups, regio-selective reactions are described. On the growing oligomers, both bromination using  $\text{P}(\text{Ph})_3/\text{CBr}_4$  and thioacetylation using  $\text{P}(\text{Ph})_3/\text{DIAD}/\text{AcSH}$  convert primary centers in the presence of several secondary alcohols. Thus, no extra protecting group must be introduced for the 2'-OH groups. The synthetic strategy developed in this work thus employs base labile protecting groups only. Butyldiphenylsilyl and benzoyl groups protect the primary alcohols during both nucleoside preparation and oligomer synthesis. A full deprotection of the oligomers is achieved in one step using 1 molar NaOH. Reactions for attaching a 6'-bimane fluorescence label and the preparation of a 3''-sulfonic acid are also reported.

To demonstrate the validity of the method, an octamer of the sequence 5'-AUGGUCAU-3', complementary to the start of the translated region of the mRNA of  $\beta$ -galactosidase, was synthesized in solution in 25 convergent steps. The monomers were coupled to dimers, which were then coupled to tetramers. Two tetramers were then coupled to yield the octamer. The GG-portion was synthesized separately (Roughton, 1994).

Each isolated intermediate and the target molecule was characterized by MS, NMR, and UV-spectroscopy.

In halogenated hydrocarbons, several partially protected sulfone-oligomers underwent intermolecular hydrogen bonding that could be reversed by the addition of methanol or methanol/water mixtures. While aggregates were formed in most cases, a UC<sup>Bz</sup> dimer self-assembled to give a non Watson-Crick ordered structure in CDCl<sub>3</sub> as determined by NMR spectroscopy.

The following scheme shows the AUGGUCAU target molecule and selected synthetic intermediates.



The non-ionic RNA-analogs described here are thermally and chemically stable under a wide range of conditions. A preliminary conformational analysis was performed on a deprotected 5'-UCAU-3' tetramer using one and two dimensional NMR techniques. Like their natural counterparts, this RNA-sulfone prefers a 3'-endo pucker of the ribose rings, which places the adjacent methylene groups in pseudo equatorial positions. Orientations along 3'-3'' and 4'-5' bonds, which connect the backbone chains and the furanoses, seem to be preferentially trans. The nucleobases are predominantly in anti conformation as required for Watson Crick base pairing.

The solubility of the AUGGUCAU octamer in water is  $\geq 5 \mu\text{M}$ . Experiments to evaluate the utility of the new RNA-analogs as antisense-inhibitors of gene expression and biochemical tools are under way.