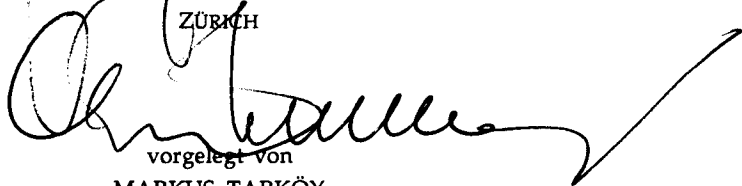


Diss. ETH Nr. 10109

**NUKLEINSÄURE-ANALOGA MIT KONFORMATIONELL
EINGESCHRÄNKTEM ZUCKER-PHOSPHAT-RÜCKGRAT (BICYCLO-DNS):
SYNTHESE UND EIGENSCHAFTEN ADENIN- UND THYMINHALTIGER
BICYCLOOLIGONUKLEOTIDE**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH



vorgelegt von
MARKUS TARKÖY
dipl. Chem. ETH
geboren am 24. Juni 1964
von Zürich

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. A. Eschenmoser, Referent
Dr. C. Leumann, Korreferent

Zürich 1993

Zusammenfassung

Angeregt durch Arbeiten von *Eschenmoser* [16] zur Homo-DNS (Oligo 2',3'-dideoxy- β -D-glucopyrano-Nukleotide), in welchen erstmals, vergleichsweise zu natürlicher DNS, entropische Stabilisierung der Duplexierung beobachtet wurde, haben wir einen neuen Nucleosidtyp –Bicyclonucleoside (5',8'-dihydroxy-2'-oxabicyclo[3.3.0]oct-3'-yl = 2'-deoxy-3',5'-ethano- β -D-ribofurano-Nucleoside)– synthetisiert. Durch die Einführung einer Ethenbrücke zwischen der C(3') und C(5') Position werden zwei der sechs für die Konformation der repetitiven Nucleotideinheit in einem DNS-Duplex verantwortlichen Torsionswinkel δ und γ in ihrer Rotationsfreiheit weitgehend eingeschränkt, bei möglichst unveränderter Geometrie. Extrapoliert auf ein Bicyclo-Oligonucleotid darf man deshalb einen höheren Präorganisationsgrad des Einzelstranges zur Duplexierung erwarten. Oligonucleotid-Analoga, die stabilere Duplexe mit natürlicher DNS bzw. RNS eingehen, sind im Rahmen der "antisense" Strategie von Bedeutung.

Ausgehend von racemischem Keton (\pm)-6 wurde in mehreren Transformationen (inkl. Racematspaltung) das bicyclische Kohlenhydratgerüst 14 in enantiomerenreiner Form aufgebaut. Die absolute Konfiguration des Zuckers wurde anhand des Camphansäurederivates des Synthesezwischenproduktes (+)-11 mittels Röntgenstrukturanalyse sichergestellt. Die Konfiguration an den neu entstandenen Chiralitätszentren (3'S und 5'R) wurde so gewählt, dass die gebildete Struktur geometrisch einer repetitiven Nucleotideinheit in einem DNS-Duplex nahekommt.

Die Synthese, der in dieser Arbeit untersuchten Adenin- (20 α und 20 β) und Thymin-haltigen Bicyclonucleoside (19 α und 19 β) gelang nach dem von *Vorbrüggen* [38] entwickelten Eintopfverfahren. Es wurden jeweils die α - wie auch β -Anomeren der entsprechenden Nucleoside isoliert; mit $^1\text{H-NMR}$ NOE-Differenz Spektroskopie konnte die Zuordnung der relativen Konfiguration am anomeren Zentrum eindeutig bestimmt werden. Eine Röntgenstrukturanalyse des Bicyclothymidinmonomeren 19 β zeigte auf, dass der Zucker eine 1'-exo Konformation einnimmt, wobei die Winkel $\gamma=149.3^\circ$ und $\delta=126.5^\circ$ betragen ($\gamma=172.8^\circ$ und $\delta=156.2^\circ$ im dT). Die Oligomersynthese wurde nach der Phosphoramiditmethode [50] an einer Festphase durchgeführt. Die Decameren von Bicyclothymidin (bcT₁₀) und Bicyclodeoxyadenosin (bcA₁₀) wurden dabei unter anderem mit massenspektroskopischen Methoden charakterisiert.

Mittels UV-, CD-Spektroskopie, Polyacrylamidgelelektrophorese und DSC Messungen ("Differential scanning calorimetry") haben wir die Paarungseigenschaften dieser bicyclischen Oligonukleotide untersucht und dabei folgendes festgestellt:

- A) Die von bcT₁₀ gebildeten Komplexe mit komplementärer DNS sind weniger stabil als die von bcA₁₀ gebildeten. Letztere sind sogar im Vergleich zu den aus natürlicher DNS erhaltenen Assoziaten stabiler.
- B) bcT₁₀ bildet vergleichbar starke Assoziate mit poly A wie natürliches dT₁₀. Jedoch sind die Komplexe zwischen bcA₁₀ und poly U deutlich stabiler als das entsprechende natürliche DNS-RNS Hybrid. bcT₁₀ bindet bevorzugt an komplementäre RNS als an entsprechende DNS.
- C) Paarungssysteme von bicyclischen A- bzw. T-Decameren, in welchen mindestens ein Strang bicyclischer Natur ist, können –im Gegensatz zu natürlichen– unter quasi physiologischen Bedingungen (0.15M NaCl) Triplexstrukturen ausbilden.
- D) In Duplexen, welche mindestens einen bicyclischen Einzelstrang enthalten, wird der Beitrag des Entropieterms ΔS und des Enthalpieterms ΔH zur freien Paarungsenthalpie ΔG vergleichsweise zum natürlichen Duplex betragsmäßig kleiner. Dabei trägt die Entropie ΔS zu einer Stabilisierung, jedoch der Enthalpieterm ΔH zu einer Destabilisierung der Duplexierung bei.
- E) Im Vergleich zu dT₁₀ zeigt bcT₁₀ eine erhöhte Nukleasenresistenz. Das Bicyclothymidin-Decamere wird von einer 5'-exo-Nuklease (calf spleen) als sehr schlechtes Substrat erkannt (~14000 x schlechter als dT₁₀). Eine unspezifische exo-endo-Nuklease (S1) baut das dT₁₀ circa 100 mal schneller ab als das bicyclische Oligomere. Wird eine 3'-exo-Nuklease (snake venom) eingesetzt, so ist das Decamere des Bicyclothymidins immerhin um einen Faktor 3 stabiler.

Summary

Stimulated by the achievements of *Eschenmoser* [16] in the synthesis of Homo-DNA (oligo 2',3'-dideoxy- β -D-glucopyrano-nucleotides), where it was first recognised that an entropic stabilisation of the complexing process is taking place, we have synthesised a new type of nucleoside, the bicyclonucleosides (5',8'-dihydroxy-2'-oxabicyclo[3.3.0]oct-3'-yl-nucleosides = 2'-deoxy-3',5'-ethano- β -D-ribofuranonucleosides). By the introduction of an ethylene-bridge between the position C(3') and C(5'), two out of six torsion angles γ and δ , responsible for the conformation of a repetitive nucleoside unit in a DNA duplex, are largely restricted in their degree of rotational freedom. Thus one can expect from a bicyclic system that the single strand possesses a higher degree of preorganisation in the complex forming process. Oligonucleotide analogues which are binding strongly to natural DNA or RNA play an important role in the 'antisense strategy'.

Starting with the racemic ketone (\pm)-6 the enantiomerically pure bicyclic carbohydrate skeleton 14 was built up in several steps (incl. racemic resolution). The absolute configuration of the sugar was established by x-ray analysis of the Camphanic acid derivative from the intermediate (+)-11. The configurations of the newly formed chiral centres (3'S and 5'R) were chosen in such a manner that the new structure closely resembled the geometry of a repetitive nucleoside-unit in a DNA duplex.

The synthesis of Adenine- (20 α and 20 β) and Thymine-bicyclonucleosides (19 α and 19 β) was successful according to the one-pot procedure of *Vorbriiggen* [38]. Both α - and β -anomers of the corresponding nucleosides were isolated. The relative configuration at the anomeric center was established by $^1\text{H-NMR}$ NOE-difference spectroscopy. X-ray structural analysis of 19 β revealed the 1'-exo conformation of the sugar with angles $\gamma=149.3^\circ$ and $\delta=126.5^\circ$ (dT has $\gamma=172.8^\circ$ and $\delta=156.2^\circ$). The solid-phase synthesis of the oligomer was performed according to the phosphoramidite method [50]. The resulting decamers of bicyclothymidine (bcT₁₀) and bicyclocodeoxyadenosine (bcA₁₀) were characterised by time of flight mass-spectrometry.

The pairing properties of the oligonucleotides were investigated by UV-, CD-spectroscopy, polyacrylamide-gel electrophoresis as well as DSC measurements ('differential scanning calorimetry') and the following results were obtained:

VIII

- A) Complexes formed from bcT₁₀ and complementary DNA are less stable than structures resulting from bcA₁₀ and DNA. In comparison to the natural duplexes the latter is even more stable.
- B) bcT₁₀ yields similarly bounded associate molecules with poly A as the ones formed by natural dT₁₀. Complexes between bcA₁₀ and poly U are remarkably more stable than the comparable natural DNA-RNA hybrid. The oligonucleotide bcT₁₀ is preferentially binding better to RNA than it does to DNA.
- C) Paired systems from bicyclic A- and T-decamers, consisting at least of one bicyclic single strand, are able to form triplex structures under nearly physiological conditions (0.15M NaCl) contrary to natural systems.
- D) In duplexes which contained at least one bicyclic single strand, the contribution of entropy (ΔS) and enthalpy (ΔH) to the free energy of pairing (ΔG) is diminished as compared to the natural duplex. Thus the entropy (ΔS) brings about stabilisation of the complex whereas the enthalpy (ΔH) is destabilising the complexing process.
- E) Under the same conditions, the resistance of bcT₁₀ to nucleases is higher compared with dT₁₀. It turned out that a 5'-exo nuclease (calf spleen) recognizes bcT₁₀ as an unsuitable substrate (about 14000 x less than dT₁₀). On the other hand a non-specific exo-endo nuclease (S1) degrades dT₁₀ about 100 times faster than it does the corresponding bicyclic oligomer. Finally the decamer of the bicyclothyridine is about 3 times more stable to 3'-exo nuclease (snake venom) than dT₁₀.