



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthetic Studies Towards Oligonucleotide Derivatives and Conjugates

Delft, P. van

Citation

Delft, P. van. (2013, September 3). *Synthetic Studies Towards Oligonucleotide Derivatives and Conjugates*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/21632>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/21632>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/21632> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Delft, Pieter van

Title: Synthetic studies towards oligonucleotide derivatives and conjugates

Issue Date: 2013-09-03

Onderzoek naar de synthese van oligonucleotide derivaten en conjugaten

De nucleïnezuren vormen een klasse biopolymeren, die essentieel zijn voor elke vorm van leven. Opgedeeld in twee structureel aanverwante klassen, vervullen DNA en RNA een aantal verschillende functies. DNA is de drager van de erfelijke informatie en RNA speelt een belangrijke rol bij de vertaling van deze informatie naar (messenger RNA) en in de synthese van eiwitten en enzymen (transfer en ribosomal RNA). De beschikbaarheid van synthetische DNA en RNA fragmenten, oligonucleotiden, heeft belangrijke bijgedragen geleverd aan de opheldering van de structuur en functie van DNA en RNA. In de afgelopen decennia zijn er verschillende methoden ontwikkeld voor de synthese van oligonucleotiden. Enkele belangrijke methoden worden beschreven in **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift, waaronder de veelgebruikte fosforamidiet chemie.

Het functionaliseren van synthetische oligonucleotiden met andere entiteiten zoals oligopeptiden, oligosachariden en kleine (bio)moleculen is in toenemende mate belangrijk geworden in het huidige onderzoek binnen de nucleïnezuur chemie en biologie. Deze zogenoemde conjugaten bieden perspectief als geneesmiddel en worden gebruikt als onderzoek gereedschap in gen regulatie. Fluorescent gelabelde oligonucleotiden worden veelal gebruikt als diagnostica door middel van de detectie van gen expressie. **Hoofdstuk 1** geeft een beknopte beschrijving enkele van deze toepassingen en een kort overzicht van bestaande methoden voor het synthetiseren van oligonucleotide conjugaten.

Recentelijk hebben er in het onderzoeksveld van de chemische biologie belangrijke ontwikkelingen plaatsgevonden op het gebied van selectieve conjugatie reacties. Deze bio-orthogonale reacties kenmerken zich door snelle omzettingen met grote selectiviteit tussen twee, anderszinds inerte, groepen in complexe matrices zoals cellysaten en het cel oppervlak. De relevantie en toepasbaarheid van deze reacties wordt besproken met het oog op de toepassing ervan voor de synthese van oligonucleotide conjugaten, een belangrijk doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek.

Hoofdstuk 2 beschrijft de toepassing van de [2+3] dipolaire Huisgen cycloadditie tussen een azide en een cyclooctyn, ook wel “koper vrije click” reactie genoemd, als nieuwe methode voor de synthese van oligonucleotide conjugaten. Door een dibenzocyclooctyn te voorzien van een zogenoemde ‘spacer’ en vervolgens te functionaliseren als phosphoramidiet was het mogelijk om met behulp van geautomatiseerde vaste drager synthese DNA en RNA oligonucleotiden te synthetiseren met aan het 5’ einde een cyclooctyn functionaliteit. Het toevoegen van equimolaire hoeveelheden van een azide bevattend fluorescentie label, een amphifiel oligopeptide of een tetrasacharide aan de cyclooctyn gefunctionaliseerde

oligonucleotiden resulteerde in snelle en volledige omzetting tot de gewenste oligonucleotide conjugaten.

De compatibiliteit van de op fosforamidiet chemie gebaseerde oligonucleotide vaste drager synthese met de introductie van cyclooctynen en de bredere toepassing ervan is het onderwerp van **Hoofdstuk 3**. De synthese van twee bouwstenen voor de introductie van de dibenzocyclooctyn entiteit aan het 3' einde van een oligonucleotide, een bouwsteen voor de introductie van een cyclooctyn in de oligonucleotide keten en een disulfide bevattend cyclooctynen phosphoramidiet reagens worden beschreven. Het gebruik van deze reagentia in vaste drager synthese leidde tot de succesvolle synthese van thymidine penta-meren gefunctionaliseerd aan de 3' of 5' uiteinden. Deze oligonucleotiden werden vervolgens gebruikt voor conjugatie reacties met azide gefunctionaliseerde tetra-sachariden of fluorescente labels. Bij alle beschreven conjugatie reacties werd volledige omzetting tot de gewenste oligonucleotide conjugaten geconstateerd. Op grond hiervan kan worden geconcludeerd dat de introductie van een dibenzocyclooctyn op elke mogelijke positie van een oligonucleotide kan worden bewerkstelligd om vervolgens te worden gebruikt in snelle en schone conjugatie reacties. Aanvullend werd een 3' cyclooctyn thymidine fosforthioaat hexameer succesvol gesynthetiseerd waarmee de stabiliteit van de dibenzocyclooctyn onder openvolgende verzwavelingsreacties werd aangetoond.

Het is bekend dat eukaryotisch RNA, in het bijzonder rRNA en tRNA een groot aantal post-translationele modificaties bevat. Een van deze modificaties is 5-methylcarboxymethyl-2-thio-uridine (mcm^5S^2U) die aanwezig is als 'wobble' base op het anticodon van lysine tRNA^{lyu}. **Hoofdstuk 4** beschrijft de synthese van enkele (oligo)ribonucleotide eiwit conjugaten met als doel antilichamen te kunnen kweken tegen deze gemodificeerde base. Als conjugatie methode werd de in hoofdstuk 2 en 3 beschreven koper vrije click chemie toegepast. De overbodigheid van additionele reagentia in deze conjugatie maakt het mogelijk om een tRNA anticodon stem-loop met daarin de mcm^5S^2U modificatie, zonder risico op degradatie, met het eiwit te verknopen. Als immunogeen eiwit werd BSA geselecteerd waarvan de lysines met behulp van 3-azidopropionzuur-*O*-succinyl ester werden voorzien van een azide. De gemodificeerde ribonucleosiden mcm^5U en mcm^5S^2U en een volledig gemodificeerde tRNA^{lyu} anticodon stem-loop met daarin de mcm^5S^2U en pseudouridine nucleotiden ingebouwd werden vervolgens gesynthetiseerd met aan het 5' einde een dibenzocyclooctyn. Conjugatie tussen azido-BSA en de mono- en oligoribonucleotiden leverden de gewenste conjugaten voor immunisatie.

Hoofdstuk 5 beschrijft een studie naar de stereoselectiviteit in de synthese van *C*-glycosiden. Hoewel *C*-glycosiden in de natuur voorkomen als antibiotica en als nucleoside isosteren met interessante eigenschappen zoals het stabiliseren van RNA secundaire structuren zijn het vooral nieuw ontworpen analoga, die veelvuldig gebruikt worden als hydrolytisch stabiele en/of fluorescente nucleosiden. Een methode voor de synthese van deze *C*-nucleosiden is het reageren van een furanose-1,4-lacton met een alkyl of aryl organolithium reagens. Het aldus gevormde hemi-ketal kan vervolgens worden gereduceerd met triethylsilane onder invloed van het Lewis zuur boor trifluoride etheraat. Deze sequentie van reacties wordt veelvuldig gebruikt voor de synthese van nucleoside analoga daar de reductie, afhankelijk van de gekozen beschermgroepen, de gewenste β isomeer levert. Voor arabinose afgeleide *C*-glycosiden zijn niet alleen slechts enkele voorbeelden bekend maar zijn de gerapporteerde stereochemische resultaten bovendien niet uniform. In beide gevallen is de achterliggende oorzaak voor de waargenomen stereochemie niet beschreven.

In **Hoofdstuk 5** wordt de reductie van enkele (gesubstitueerde)phenyl, vinyl en methyl arabinose en ribose afgeleide hemi-ketalen beschreven. De daaruit ontstane C-glycosiden hadden in het geval van de ribose derivaten de verwachte β stereochemie. Daarentegen werd voor de aromatisch gesubstitueerde arabinose derivaten een hoge selectiviteit voor en in het geval van methyl en vinyl slechts uitsluitend de α stereochemie waargenomen. Een verklaring van de tegengestelde stereoselectiviteit in de reductie van de ribose en arabinose afgeleide hemi-ketalen werd gevonden door toepassing van het model van *Woerpel et al.* Hierin wordt gesteld dat voor secundaire ribofuranose oxocarbenium-ionen de E_3 envelop de meest stabiele grondtoestand vormt doordat in deze conformeer de 3-O-alkoxy substituent pseudoaxiaal staat en daardoor het oxocarbenium-ion kan stabilizeren. Aanval van een nucleofiel aan de binnenkant (α) zijde (*inside attack*) van deze envelop vanwege stereoelectronische redenen stuurt de stereoselectiviteit. Dit sluit aan bij de geobserveerde stereochemie voor de reductie van de ribose hemi-ketalen. De α selectiviteit in de arabinose C-glycosiden moet derhalve bepaald worden door de 3E envelop als meest stabiele grondtoestand gevolgd door aanval van de β zijde van het hydride. Dit kan worden verklaard door de ongunstige 1,3-diaxiale interactie tussen de 2-O-benzyloxy en C-4 substituenten in de E_3 envelop. Om dit vast te stellen werd er, gebaseerd op het werk van *Rhoad et al.*, gerekend aan de stabiliteit van de oxocarbenium-ionen in de verschillende mogelijke conformeren. Het bepalen van de relatieve energie van deze grondtoestanden wees uit dat de ribose afgeleide oxocarbenium-ionen inderdaad een grote voorkeur hebben voor de E_3 conformeer (> 2 Kcal/mol) en de arabinose oxocarbenium-ionen een kleinere (1 Kcal/mol) voorkeur hebben voor de 3E conformer. Dus de triethylsilane/ BF_3OEt_2 reducties van ribose afgeleide hemiketalen leveren β -C-glycosiden doordat de gevormde oxocarbenium-ionen reageren vanuit een E_3 conformeer door een *inside attack*. Arabinose afgeleide hemiketalen vormen 3E oxocarbenium-ionen waardoor als gevolg van *inside attack* α -C-glycosiden worden geïsoleerd.

Hoofdstuk 6 beschrijft het ontwerp en de synthese van een nieuw type cyclooctyn genaamd RITRICO die het introduceren van een cyclooctyn in een oligonucleotide sequentie mogelijk maakt. Dit cyclooctyn is middels een triazole gekoppeld aan het anomere centrum van D-ribose, waardoor deze verbinding analogie vertoont met de natuurlijk voorkomende purine basen. 1-azido-1-deoxy-D-ribose werd in een koper vrije click reactie geannuleerd met 4-bromo-4-ene-cyclooct-1-yne. Eliminatie van het vinylisch bromide leverde het cyclooctyn en daarmee de RITRICO kern. Deze werd vervolgens omgezet in een beschermde fosforamidiet bouwsteen, geschikt voor vaste drager oligonucleotide synthese. De synthese van een TT-RITRICO-TT pentameer en de succesvolle conjugatie daarvan met twee verschillende azide bevattende fluorescente labels toonde aan dat deze nieuwe bouwsteen gebruikt kan worden voor de synthese van oligonucleotide conjugaten. Incorporatie van het RITRICO nucleoside in een RNA 13-meer bleek ook succesvol alsmede de conjugatie ervan met een 3-azidocoumarine derivaat. Om het effect van een dergelijke modificatie op een dubbele helix te onderzoeken werd het complementaire DNA fragment gesynthetiseerd. Conjugatie van de DNA-RNA dubbele helix met het eerder genoemde 3-azidocoumarine derivaat bleek ook snel te verlopen. Tot slot werd het effect van de RITRICO modificatie en derivatisering daarvan, als gevolg van conjugatie, op de structuur van een dubbele helix onderzocht. Hiertoe werd ook de niet gemodificeerde RNA-DNA duplex gesynthetiseerd en werden de circulaire dichroïsme spectra van de drie helices met elkaar vergeleken. Hieruit bleek dat alle drie de helices de verwachte A-helix vorm hadden. Bovendien bleek dat de RITRICO modificatie geen direct zichtbaar effect lijkt te hebben op secundaire structuur. Ook de structuur van de A-helix bleek na conjugatie met 3-azidocoumarine intact.

