

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde das α -Hydroxybenzylphosphonat-Oligonucleotidkonzept erweitert, indem neue Synthesemöglichkeiten für modifizierte Bausteine und Oligonucleotide gefunden wurden. In bisherigen Arbeiten wurden Thymidinoligonucleotide modifiziert und deren Eigenschaften untersucht. Bei der Anwendung auf gemischte, biologisch relevante Antisense-Sequenzen treten neue Herausforderungen, z.B. bezüglich der Schutzgruppen und der Aufarbeitung auf. Mit dieser Arbeit wurden neue Möglichkeiten zur Synthese von α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierten Bausteinen geschaffen und dabei die Reaktionsmöglichkeiten zu Hydroxy-2-Nitrophenylmethyl-phosphonaten und -phosphinaten erweitert.

Das Synthesekonzept über dimere α -Hydroxybenzylphosphonatdinucleotide wurde auf ein gemischtes Dinucleotid angewandt. Die Wahl fiel hier auf das Adenosyl-Thymidyl-Dimer **1-4**, welches in 3'-und 5'-Position einer anti H-*ras* Sequenz **ODN3-5** und in die mittlere Position einer anti Influenza Sequenz **ODN8** eingebaut wurde.

Die Synthese der dimeren AT-Bausteine **3** und **4** ist in (Abbildung 1) zusammengefasst. Ausgehend von Thymidin **18** und 2'-Desoxyadenosin **24** konnten die Bausteine in einer insgesamt 13 stufigen Synthese synthetisiert werden. Im Laufe dieser Synthese wurden einige synthetische Verbesserungen eingeführt (z.B. H-Phosphonatbildung mittels Diphenylphosphit und Synthese des Phosphoramidites mittels Phosphor-bis(di-*iso*-propylamidit) und DCI) und Synthesestufen konnten optimiert werden (Kapitel 4.1.2).

In früheren Arbeiten wurden unterschiedliche T_m -Werte für die R_P -, bzw. S_P -diastereomeren Oligonucleotide gefunden. Um mögliche unterschiedliche Eigenschaften der Diastereomere zu untersuchen, wurden die Diastereomere bezüglich des Phosphonates getrennt erhalten und in Oligonucleotide eingebaut. Es konnte bereits in meiner Diplomarbeit gezeigt werden, dass es auch möglich ist, die Diastereomere bezüglich des α -C-Atoms getrennt zu erhalten, was Gegenstand einer anderen Arbeit in diesem Arbeitskreis ist.

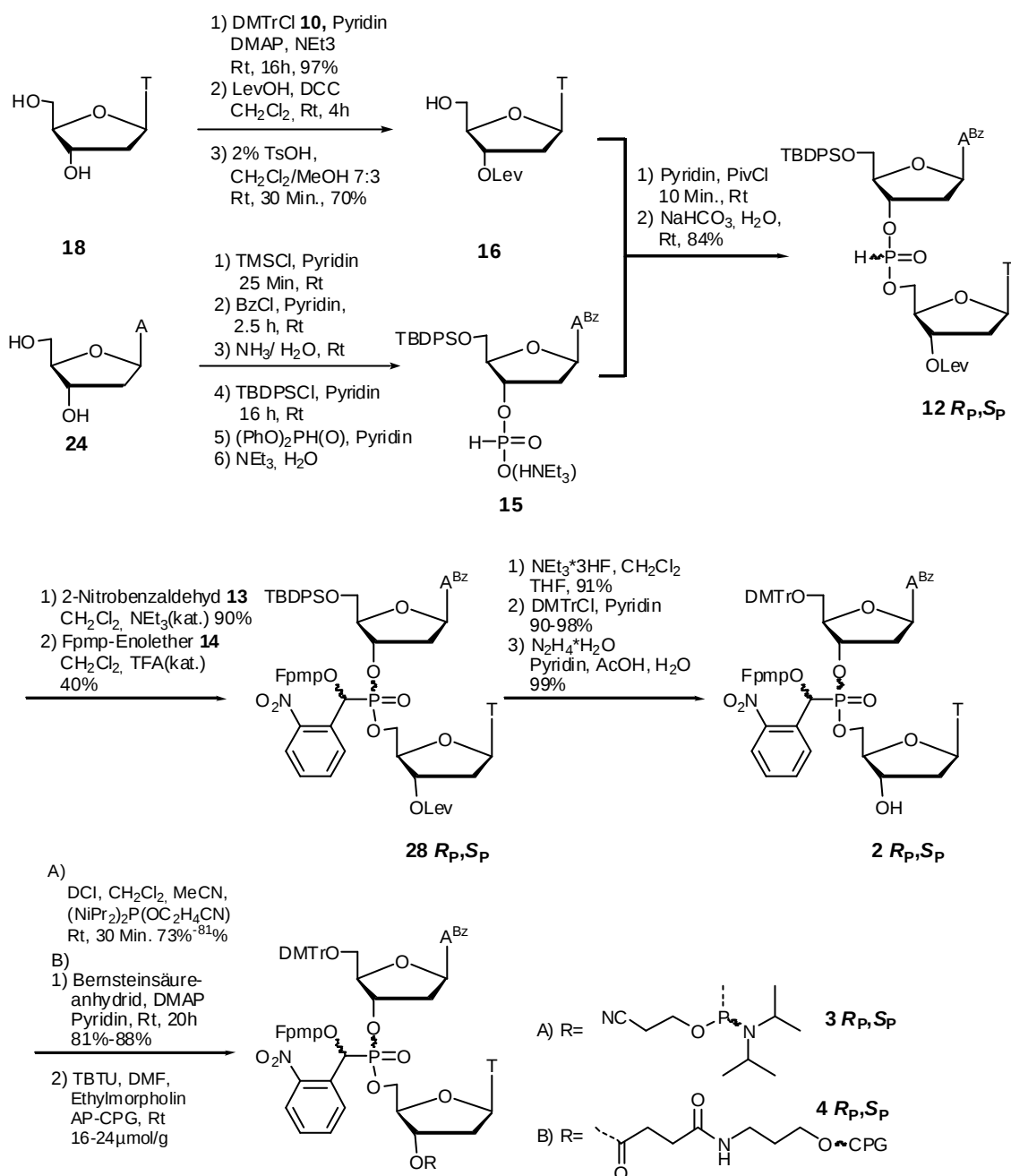


Abbildung 1 Synthese der α-Hydroxybenzylphosphonatdinucleotide **3** und **4**

Durch Einsatz dieser dimeren Bausteine **3&4** als „Quasimonomer“ in der automatisierten DNA-Festphasensynthese wurden nach Entschützung der α-Hydroxygruppe die modifizierten anti H-*ras*-Onkogen Oligonucleotide **ODN3-5** und anti Influenza Oligonucleotide **ODN7&8** erhalten (Kapitel 4.4). Von diesen Oligonucleotiden wurden die thermodynamischen Eigenschaften im Duplex mit einem DNA-, bzw. RNA-Gegenstrang bestimmt. Die Schmelzpunkte (*T_m*-Wert) liegen ein bis zwei Grad unter dem

unmodifizierten Referenzstrang, mit Ausnahme des am 3'-Ende- S_P modifizierten **ODN4 S_P** (Kapitel 4.4.4). Außerdem wurden Stabilitätsuntersuchungen gegen die Exonuclease I durchgeführt (Kapitel 4.4.5). Es konnte eine deutliche Erhöhung der Nucleasestabilitäten festgestellt werden, was eine mögliche Anwendbarkeit dieses Konzeptes gewährleisten sollte. Um bessere Aussagen zu den Einflüssen der α -Hydroxybenzylphosphonat-Modifikation liefern zu können, ist es notwendig eine Reihe verschiedener Sequenzen zu modifizieren und in Bezug zur Sequenz, der Position und der Anzahl der Modifikationen zu untersuchen.

Für die Modifizierung beliebiger DNA-Sequenzen mit den phosphonatmodifizierten Bausteinen ist es notwendig 16 verschiedene Bausteine zu synthetisieren. Mit der in Abbildung 1 dargestellten Syntheseroute ist man bereits zu Beginn der Synthese auf eine Dinucleotidkombination festgelegt und muss alle Syntheseschritte an diesem Dinucleotid vollziehen. Um eine Vielzahl verschiedener Sequenzen untersuchen zu können, ist es daher notwendig einen kürzeren und flexibleren Syntheseweg zu diesen Dinucleotiden zu finden.

Eine neue Synthesestrategie für α -Hydroxybenzylphosphonatdinucleotide wurde entwickelt (Kapitel 4.1.4 % 4.1.4.4). Die Syntheserversuche über einen Phosphonat-Precursor sind in Abbildung 2 dargestellt. Ziel war es einen Precursor zu entwickeln, welcher die Modifikation trägt und erst abschließend mit den Nucleosiden gekuppelt wird. Als mögliche Synthesestrategien kamen α -Hydroxybenzylphosphonsäure-diphenylester, -phosphordichloridat und -phosphonsäure in Betracht. Die entsprechenden Precursor **6-9 a-d** wurden synthetisiert und Kupplungsversuche wurden unternommen. Aufgrund stark verringerter Reaktivität und der fehlenden Orthogonalität der abschließenden Kupplungsschritte wurden diese Synthesestrategien letztlich verworfen.

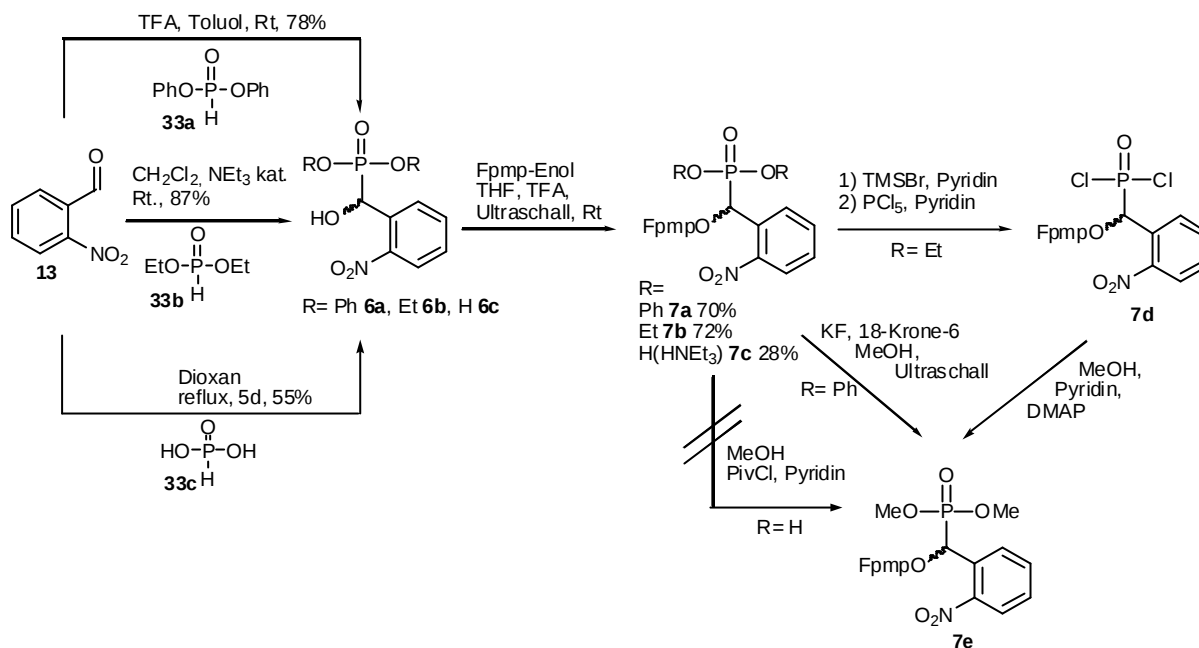


Abbildung 2 Syntheserversuche über Phosphonatprecursor

Die Synthese über einen universellen α -Hydroxybenzylphosphinat Precursor sind in Abbildung 3 dargestellt. Es gelang einen Precursor zu entwickeln, welcher in zwei zueinander orthogonalen Kupplungsschritten mit Nucleosiden zum modifizierten α -O-Benzylphosphonatdinucleotid umgesetzt werden kann. Hierbei gelang es, Reaktionen, welche aus der Phosphonatchemie bekannt sind, auf Phosphinate zu übertragen (Pudovic-, Atherton-Todd-Reaktion, Piv-Cl-Kupplung). Hierfür wurden kinetische Untersuchungen durchgeführt und der stereochemische Verlauf dieser Reaktion wurde untersucht. Der Phosphinatbaustein wurde in dieser Arbeit ursprünglich für die Synthese eines monomeren α -O-Benzylphosphonamiditbausteines entwickelt. Die dimeren Bausteine haben den großen Vorteil, dass die Stereochemie am Phosphor durch Diastereomerentrennung während der Synthese definiert ist. Allerdings sind für die Modifikation beliebiger Sequenzen 16 verschiedene Bausteine notwendig deren Synthese auch mit der neuen Synthesemethode lang und aufwendig ist. Ausserdem ist so nur jede zweite Position der DNA modifizierbar. Um beliebige Sequenzen an beliebigen Positionen zu modifizieren, ist die Entwicklung monomerer Phosphonamidit Bausteine notwendig, die analog zu den Standardamiditen in der automatisierten Festphasensynthese eingesetzt werden können. So sind nur vier Bausteine notwendig. Die Synthese eines solchen Phosphonamidit Bausteines wurde entwickelt (Abbildung 3 & Kapitel 4.2).

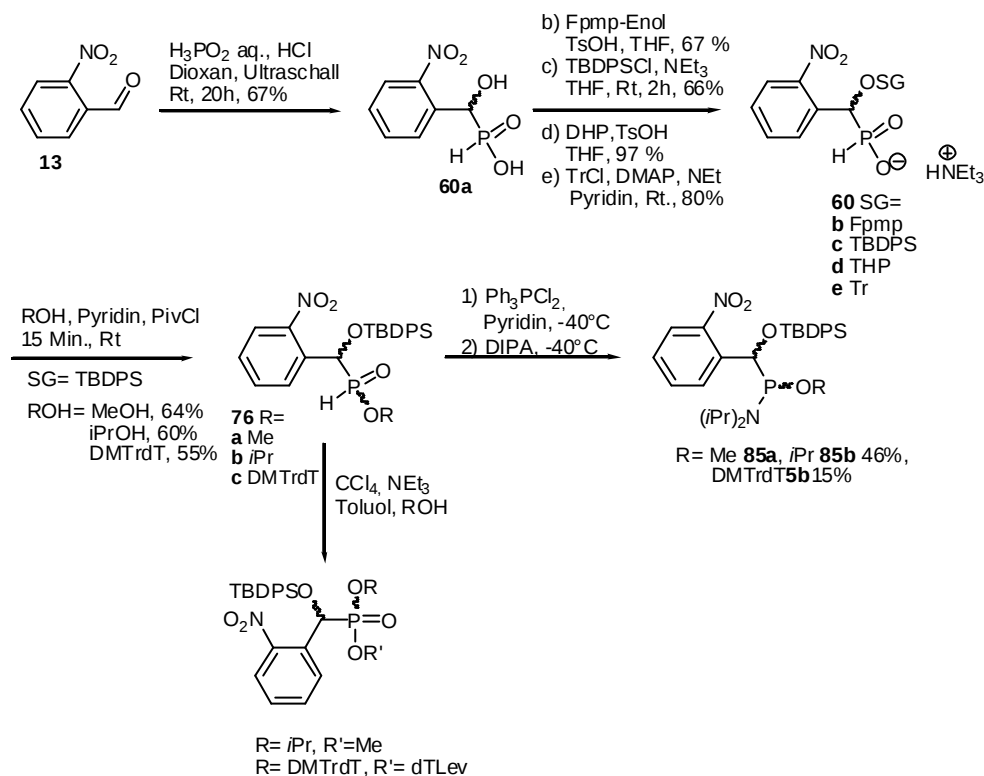


Abbildung 3 Universeller Phosphinatprecursor zur Synthese von monomeren α-Hydroxybenzylphosphonamiditen und dimeren α-Hydroxybenzylphosphonaten

Mit der Synthese des α-O-Benzylphosphinatprecursors ist es gelungen einen universellen Baustein zu entwickeln, mit Hilfe dessen es möglich ist, sowohl die Strategie über monomere Phosphonamidite als auch über dimere Bausteine zu verfolgen.

Problematisch bleibt die Synthese der modifizierten Oligonucleotide und deren Aufarbeitung. Sowohl Synthese als auch Aufarbeitung und Analytik dieser α-Hydroxy-2-nitrobenzylphosphonat Oligonucleotide müssen weiterhin verbessert werden. Der Einsatz von dimeren Bausteinen in der Oligonucleotidsynthese hat sich bewährt und liefert einigermaßen zuverlässige Ergebnisse. Zu überprüfen bleibt, ob auch die α-Hydroxybenzylphosphonamidit-Bausteine in der automatisierten DNA-Synthese eingesetzt werden können.

SUMMARY

α -Hydroxybenzylphosphonate modified oligonucleotides have been developed as possible antisense oligonucleotides in previous works and model thymidine oligonucleotides have been studied extensively. It was shown that the melting points with their complementary DNA and RNA strand respectively are in the range of an unmodified reference strand. Also the high stability towards exonucleases (SVP and CSP) is promising for a potential application as antisense drugs. These modified oligonucleotides were synthesized via automated DNA synthesis using modified dimer α -hydroxybenzylphosphonate building blocks.

Aim of this work was to find novel synthetic strategies towards these modified oligonucleotides for the application in mixed biologically relevant sequences.

First of all adenine-thymidine dimer building blocks **1-4** were prepared and diastereoisomers with respect to the phosphorus center were separated (chapter 4.1.2, scheme 1). They were applied to automated DNA synthesis as a phosphoramidite **3** and a solid supported building block **4**. Anti *H-ras* sequences from the initiation region were 3'-end and 5'-end modified and an anti influenza sequence was modified in the middle. The thermodynamic data (T_m , ΔG , ΔH , ΔS) of these sequences were determined as well as their stability toward exonuclease I (chapter 4.4).

For the synthesis of a wide range of biologically relevant sequences the synthesis of 16 different dimer building blocks are necessary. The conventional synthesis of these dimer building blocks is long (13 steps) and inflexible. One is fixed to a nucleoside combination right at the beginning of the synthesis and it is necessary to modify the dimer in the course of the following steps. Novel synthetic pathways to dimer building blocks via α -hydroxybenzylphosphonate precursors were evolved (scheme 2 and chapter 4.1.4) and a universal phosphinate building block was found that could be used as a universal precursor as well for the synthesis of the dimer phosphonate building blocks (chapter 4.1.4.4) and monomer phosphoramidites (scheme 3).

Modifying any biologically relevant sequences would mean the synthesis of 16 different dimer building blocks. Besides it is only possible to modify every second position in the oligonucleotide. The synthesis of a monomer α -hydroxybenzylphosphoramidite was

developed which can be used analogous to the standard phosphoramidites in DNA synthesis (chapter 4.2). The advantage of the dimer building blocks is the possibility to control the stereo centres of the modification, whereas the use of monomer building blocks is the flexibility in the synthesis of different sequences.

developed which can be used analogous to the standard phosphoramidites in DNA synthesis (chapter 4.2). The advantage of the dimer building blocks is the possibility to control the stereo centres of the modification, whereas the use of monomer building blocks is the flexibility in the synthesis of different sequences.