

Metody syntezy modyfikowanych oligonukleotydów i ich analogów — potencjalnych inhibitorów ekspresji genów w strategii antysensowej

Andrzej Okruszek
Centrum Badań Molekularnych
i Makromolekularnych PAN
Łódź

1. Wstęp

W pierwszym etapie rozwoju strategii antysensowej, poczynając od pionierskich prac Zamecnika i Stephenson [1], jako inhibitorów ekspresji „niechcianych” genów używano syntetycznych oligodeoksyrybonukleotydów o strukturze fosfodiesterów, identycznej do jednoniciowych fragmentów naturalnego DNA. Wkrótce okazało się jednak, że takie „normalne” oligonukleotydy posiadają dwie wady, które w istotny sposób ograniczają ich zastosowanie: są niezwykle wrażliwe na hydrolityczną degradację katalizowaną przez obecne w komórkach nukleazy (zwłaszcza 3'-egzonukleazy [2]), oraz posiadają ograniczone zdolności do migracji przez błony komórkowe [3]. Stanowiło to impuls do poszukiwania analogów oligonukleotydów, które zachowując podstawowy element struktury odpowiedzialny za właściwości hybrydyzacyjne, tj. obecność w cząsteczce zasad nukleinowych (bądź ich analogów) rozmieszczonych w taki sposób, aby możliwe było utworzenie wiązań wodorowych typu Watsona-Cricka z komplementarną nicią RNA, posiadałyby wyższą trwałość na degradację nukleolityczną oraz lepsze właściwości przenikania przez błony biologiczne. Artykuł ten zawiera przegląd metod umożliwiających chemiczną syntezę takich oligomerów. Bardziej szczegółowy opis zawierają wydane niedawno monografie [4 - 6] oraz cytowane w nich prace oryginalne.

2. Analogi oligonukleotydów zachowujące szkielet fosforanowo-cukrowy

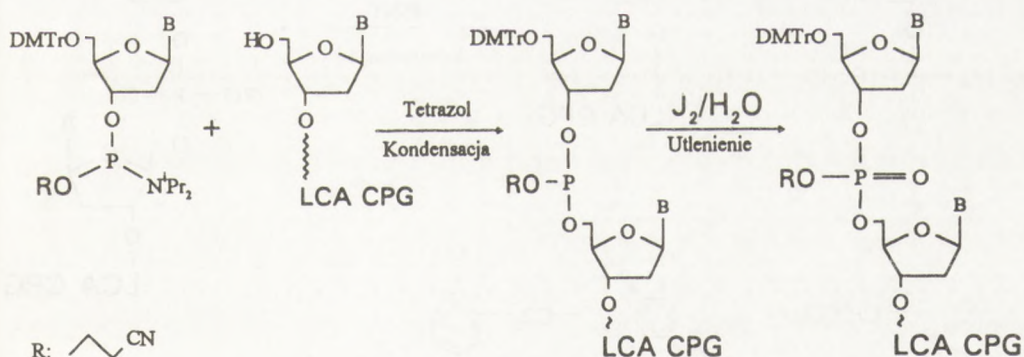
Analogi zachowujące szkielet fosforanowo-cukrowy są najbliższymi spokrewnione pod względem struktury z „normalnymi” oligodeoksyrybonukleotydami i drogi prowadzące do ich syntezy są często modyfikacjami procedur synte-

tycznych służących do otrzymywania naturalnych fragmentów jednoniciowego DNA. Krótka prezentacja najważniejszych metod syntezy niemodyfikowanych oligodeoksyrybonukleotydów ułatwi zatem opis dróg syntezy ich modyfikowanych analogów.

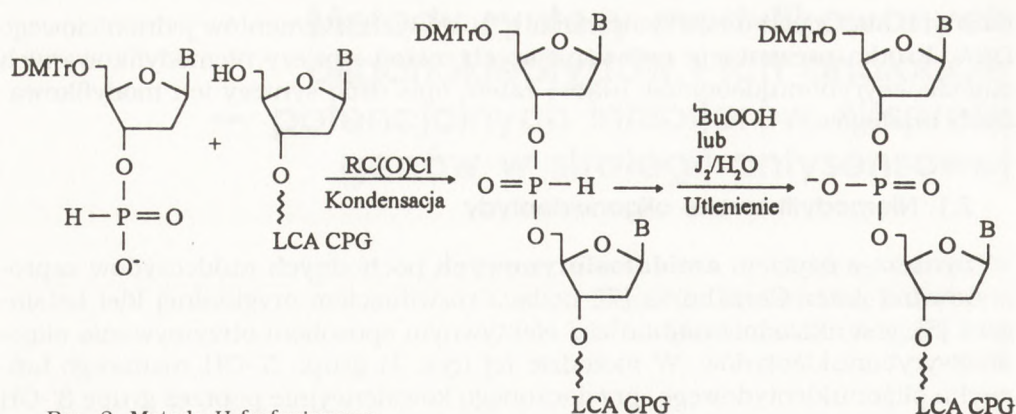
2.1. Niemodyfikowane oligonukleotydy

Synteza z użyciem **amidofosforynowych** pochodnych nukleozydów zaproponowana przez Caruthersa [7], będąca rozwinięciem oryginalnej idei Letsingera [8], jest aktualnie najbardziej efektywnym sposobem otrzymywania oligodeoksyrybonukleotydów. W metodzie tej (rys. 1) grupa 5'-OH rosnącego łańcucha oligonukleotydowego, przyłączonego kowalencyjnie poprzez grupę 3'-OH i odpowiedni łącznik (LCA) do stałego nośnika (najczęściej granulki szklane o kontrolowanej porowatości — CPG), reaguje z użytą w 20-krotnym nadmiarze 3'-O- β -cyjanoetylo-N,N-diizopropylamidofosforynową pochodną nukleozydu wobec tetrazolu jako katalizatora (etap kondensacji). Utworzony fosforyn jest w kolejnym etapie syntezy utleniany roztworem jodu w obecności wody do pochodnej fosfortriestrowej, a nieprzereagowane grupy 5'-OH są blokowane przez acetylowanie (*capping*). Przejście do kolejnego cyklu syntezy wymaga usunięcia kwasolabilnej grupy dimetoksytrytylowej (DMTr) z terminalnej funkcji 5'-OH za pomocą roztworu kwasu dichlorooctowego. Wydajność przyłączenia kolejnego nukleotydu w metodzie amidofosforynowej przekracza 99%, a średni czas trwania pojedynczego cyklu syntezy wynosi 7–8 min. Grupa β -cyjanoetylowa osłaniająca funkcję fosforanową jest usuwana w trakcie hydrolytycznego uwalniania zsyntetyzowanego oligonukleotydu ze stałego nośnika roztworem amoniaku. Po usunięciu grup blokujących zasady nukleinowe oligonukleotyd jest oczyszczany metodą chromatografii cieczowej (HPLC).

W drugiej połowie lat osiemdziesiątych jako konkurencyjna w stosunku do metody amidofosforynowej syntezy oligodeoksyrybonukleotydów została wprowadzona przez Stawińskiego oraz Froehlera tzw. **metoda H-fosfonianowa**

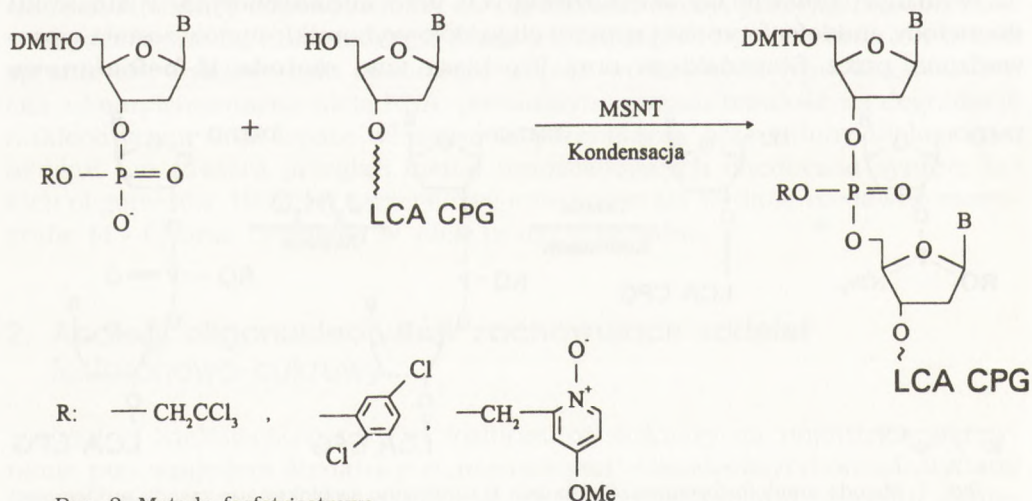


Rys. 1. Metoda amidofosforynowa. Symbolem B oznaczone są blokowane zasady nukleinowe: tymina, N⁴-benzoilocytozyna, N⁶-benzoiloadenina, N²-izobutyryloguanina.



Rys. 2. Metoda H-fosfonianowa.

[9,10], oparta na oryginalnej koncepcji Todda [11]. Metoda ta jest również realizowana w sposób zautomatyzowany, na stałym nośniku. Jej zaletą jest wyższa trwałość nukleotydowych prekursorów oraz brak konieczności blokowania grupy fosforanowej w trakcie syntezy. W metodzie H-fosfonianowej (rys. 2) grupa 5'-OH rosnącego łańcucha oligonukleotydowego reaguje z 3'-H-fosfonianem nukleozydu aktywowanym za pomocą sterycznie zawadzonego halogenku acylowego takiego jak chlorek piwaloiłu lub chlorek adamantoiłu. Proces utleniania do pochodnej fosfodiesterowej jest realizowany po zakończeniu syntezy całego łańcucha oligonukleotydowego, jednocześnie w stosunku do wszystkich internukleotydowych mostków H-fosfonianowych. Jako czynnik utleniający stosuje się roztwór jodu w obecności wody lub roztwór wodorodadtlenku tert-butyłowego. Pozostałe etapy cyklu syntetycznego („detrytylacja”, *capping*) są identyczne jak w metodzie amidofosforynowej.



Rys. 3. Metoda fosfotriestrowa.

Trzecim sposobem syntezy oligonukleotydów, który warto tu wymienić jest tzw. **metoda fosfotriestrowa**. Pomimo to, że dominowała ona w syntezie oligonukleotydów do początku lat osiemdziesiątych, aktualnie traktowana jest jako metoda „z wyboru” jedynie do syntezy na dużą skalę preparatywną [12]. W metodzie tej (rys. 3) grupa 5'-OH rosnącego łańcucha oligonukleotydowego reaguje z 3'-fosfodiestrową pochodną nukleozydu po jej aktywacji za pomocą 3-nitro-triazolidu kwasu 2,4,6-triazopropylbenzenosulfonowego (MSNT), dając produkt o strukturze „utlenionego” fosfotriestru. W wielu znanych wariantach metody fosfodiestrowej używano różnych aktywatorów o strukturze azolidów kwasów arenosulfonowych oraz różnych grup osłaniających funkcję fosforanową.

2.2. Oligometylofosfoniany* nukleozydów

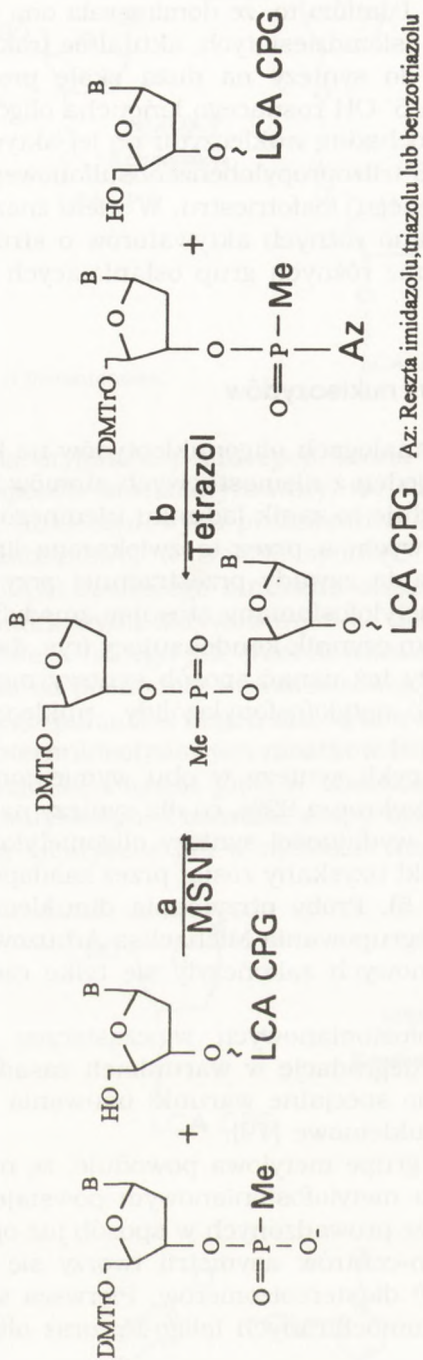
W metylofosfonianowych analogach oligonukleotydów na każdym internukleotydowym atomie fosforu jeden z niemostrkowych atomów tlenu jest zastąpiony grupą metylową. Powoduje to zanik ładunku ujemnego na internukleotydowych resztach fosforanowych, a przez to zwiększoną lipofilowość oligonukleotydów, bez wprowadzania zawady przestrzennej przy atomie fosforu. Miller i Ts'o [13] otrzymali metylofosfoniany stosując zmodyfikowaną metodę fosfotriestrową oraz MSNT jako czynnik kondensujący (rys. 4a). Jako odmianę metody fosfotriestrowej należy też uznać sposób syntezy metylofosfonianów, w którym używane są 3'-metylofosfonylazolidy nukleozydów [14 - 16] (rys. 4b).

Wydajność pojedynczych cykli syntezy w obu wymienionych wariantach metody fosfotriestrowej nie przekracza 92%, co dla syntezy na nośniku stałym jest wartością niską. Wzrost wydajności syntezy oligometylofosfonianów nukleozydów do 96 - 97% na cykl uzyskany został przez zaadaptowanie strategii amidofosforynowej [17] (rys. 5). Próby otrzymania dinukleozydometylofosfonianów w wyniku reakcji przegrupowania Michaelisa-Arbuzowa odpowiednich pochodnych O-metylofosforynowych zakończyły się tylko częściowym powodzeniem [18].

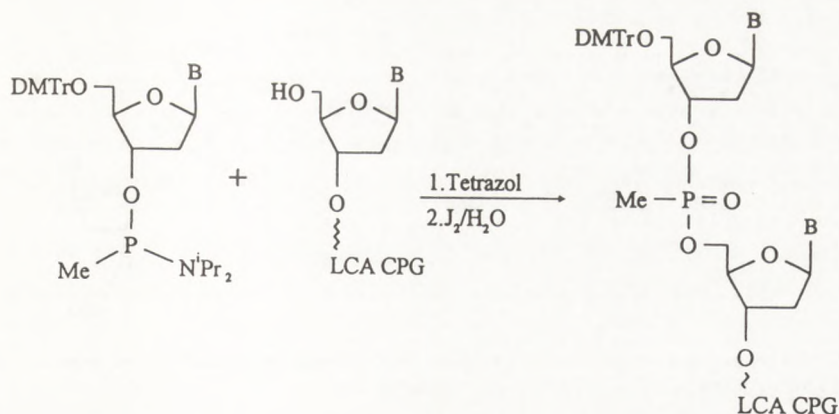
Obecność funkcji metylofosfonianowych w cząsteczce oligonukleotydu zwiększa jego podatność na degradację w warunkach zasadowych i dlatego dla tych połączeń opracowano specjalne warunki usuwania zasadolabilnych grup osłaniających zasady nukleinowe [19].

Zamiana atomu tlenu na grupę metylową powoduje, że na każdym internukleotydowym ugrupowaniu metylofosfonianowym powstaje nowe centrum asymetrii. W przypadku syntez prowadzonych w sposób już opisany dla oligonukleotydów zawierających n -centrów asymetrii tworzy się, w przybliżeniu równomolowa, mieszanina 2^n diastereoizomerów. Pierwsza stereoselektywna synteza stereoregularnych, homochiranych (oligo- R_P oraz oligo- S_P) metylofo-

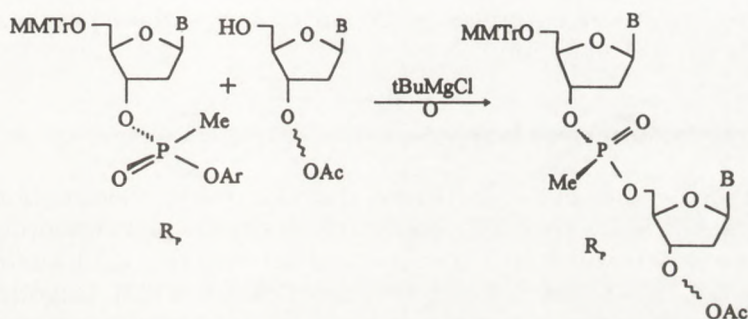
* Niektórzy autorzy używają określenia „metanofosfoniany”.



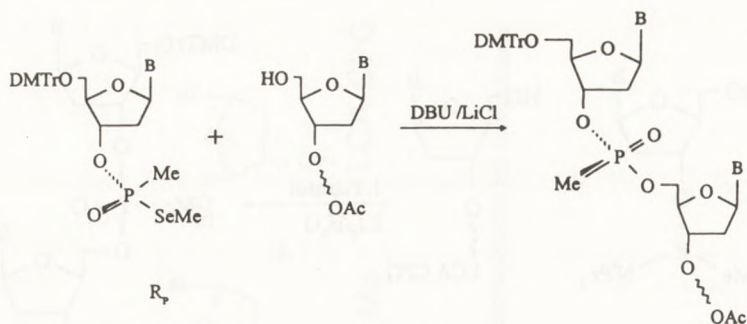
Rys. 4. Synteza oligometylofosfonianów nukleozydów metodą fosfortriestrową.



Rys. 5. Wariant „amidofosforynowy” syntezy oligometylofosfonianów nukleozydów.

Rys. 6. Stereokontrolowana synteza oligometylofosfonianów nukleozydów poprzez aktywne estry p-nitrofenylowe. Przykład syntezy centrum o konfiguracji R_p.

sfonianów nukleozydów została zrealizowana w laboratorium Steca [20]. Wykazano, że rozdzielone uprzednio metodą chromatograficzną diastereoizomery R_p i S_p 5'-O-monometoksytrytylo-3'-O-(p-nitrofenylo)metylofosfonianów tymidyny reagują z 3'-O-acetylotymidyną wobec chlorku tert-butylo-magnezowego jako aktywatora grupy 5'-OH ze stereoselektywnością 95%, z inwersją konfiguracji przy atomie fosforu. Przy zastosowaniu tej metody otrzymano homochiralne tetrametylofosfoniany tymidylowe [20] oraz heksametylofosfoniany o sekwencji d(APMeAPMeTPMeTPMeCPMeT) [21]. W tym samym laboratorium opracowano również alternatywne podejście do stereokontrolowanej syntezy oligometylofosfonianów nukleozydów z użyciem diastereoizomerycznie czystych 3'-O-(selenometylo)metylofosfonianów nukleozydów jako P-chiralnych prekursorów oraz mieszaniny DBU (1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-ene) i chlorku litu jako aktywatora [22] (rys. 7).



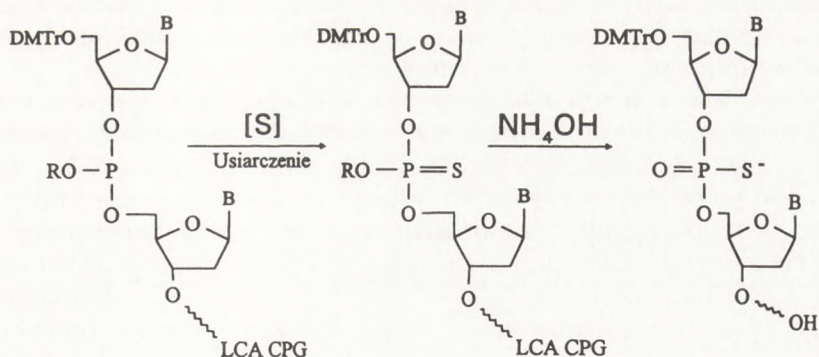
Rys. 7. Stereokontrolowana synteza oligometylofosfonianów nukleozydów poprzez aktywne estry seleniowe. Przykład syntezy centrum o konfiguracji S_p.

W ten sposób zsyntetyzowano homochiralne pentametylofosfoniany o sekwencji d(T_{PMc}C_{PMc}C_{PMc}T_{PMc}G). Te stereoregularne oligomery zostały otrzymane w kilkietapowych reakcjach „w roztworze” — próby zaadaptowania każdego z przedstawionych procesów do warunków wydajnej syntezy na stałym nośniku nie powiodły się.

2.3. Oligotiofosforany nukleozydów

Tiofosforanowe analogi nukleotydy, charakteryzujące się najbliższym podobieństwem strukturalnym do swoich naturalnych pierwowzorów, zostały wprowadzone do klasycznych badań w zakresie enzymologii kwasów nukleinowych pod koniec lat sześćdziesiątych przez Ecksteina [23]. Oligotiofosforany nukleozydów, w których w każdym wiązaniu internukleotydy jeden z niemostrkowych atomów tlenu jest zastąpiony atomem siarki, zostały po raz pierwszy otrzymane drogą chemicznej syntezy metodą amidofosforynową przez Steca i Zona [24]. W typowej procedurze (rys. 8), w etapie utlenienia powstającej pośrednio pochodnej trikoordynacyjnego fosforu, zamiast roztworu jodu podaje się roztwór odczynnika usiarczającego. Początkowo do usiarczania stosowane były roztwory elementarnej siarki w 2,6-lutydynie bądź w mieszaninie CS₂-pirydyna [24], jednak aktualnie wykorzystuje się do tego celu bardziej aktywne odczynniki o charakterze organicznych disiarczaków, takie jak: 1,1-ditlenek-3H-1,2-benzoditiol-3-onu (odczynnik Beaucage'a) [25], disiarczek tetraetylotiuramu (TETD) [26] oraz opracowany w laboratorium Steca disiarczek bis(O,O-diizopropoksyfosfinitioyłu) (S-Tetra) [27].

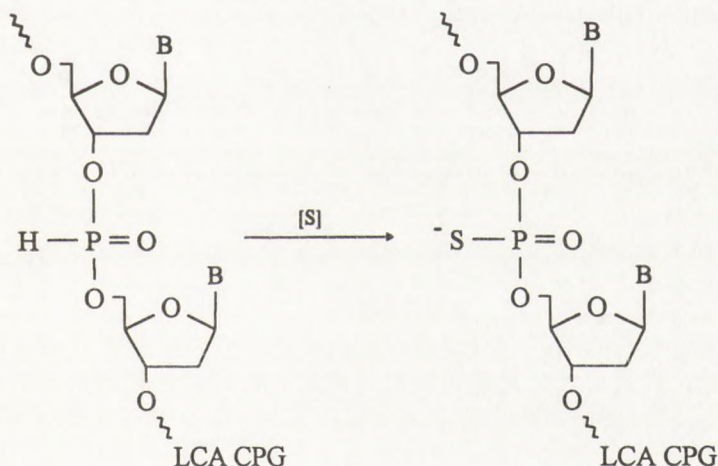
Zastosowanie metody amidofosforynowej umożliwia syntezę sekwencji „mieszanych”, w których tylko wybrane grupy fosforanowe są modyfikowane siarką [28]. Stosuje się wówczas sekwencyjne podawanie odczynnika utleniającego bądź usiarczającego korzystając z tego, że roztwór jodu, podawany w etapach utleniania, nie posiada właściwości utleniających w stosunku do triestrów tiofosforanowych, tworzących się jako bezpośrednie produkty reakcji



Rys. 8. Synteza oligotiofosforanów nukleozydów metodą amidofosforynową.

usiarczenia. Wydajności oligotiofosforanów nukleozydów otrzymywanych metodą amidofosforynową są porównywalne z uzyskiwanymi podczas syntezy naturalnych fragmentów DNA.

Do syntezy oligotiofosforanów nukleozydów jest również wykorzystywana metoda H-fosfonianowa, w której etap utlenienia zastąpiony jest reakcją z jednym z wymienionych odczynników usiarczających [29,30] (rys. 9). Etap ten realizowany jest „zbiorczo”, po zakończeniu przyłączenia ostatniej jednostki nukleotydu. Stanowiło to istotne ułatwienie w początkach rozwoju tej metody, gdy etap usiarczania był realizowany za pomocą mało aktywnego roztworu elementarnej siarki [9,10]. Konieczność „zbiorczego” usiarczenia nie pozwala jednak stosować metody H-fosfonianowej do syntezy sekwencji „mieszanych” fosforanowo-tiofosforanowych.



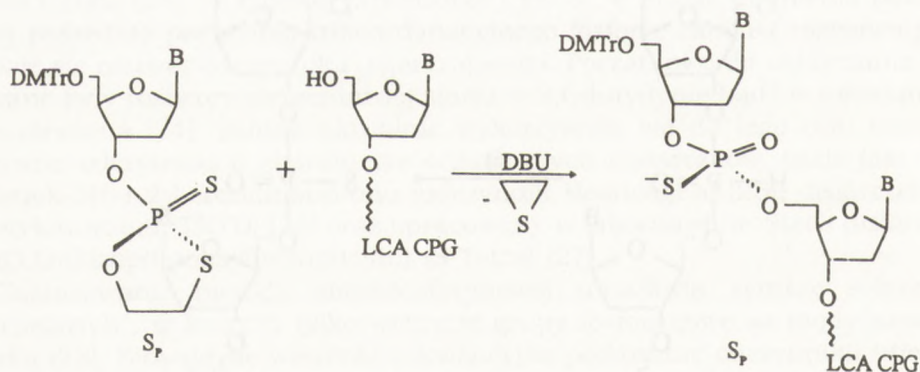
Rys. 9. Synteza oligotiofosforanów nukleozydów metodą H-fosfonianową.

Do otrzymywania oligotiofosforanów nukleozydów Reese [31] i van Boom [32] zastosowali również wariant metody fosfortriestrowej, jednak stosunkowo niskie wydajności oraz dłuższy czas trwania cyklu nie spowodowały większego zainteresowania tym podejściem badawczym.

Podobnie jak w przypadku pochodnych metylofosfonianowych, zamiana jednego atomu tlenu na atom siarki wprowadza dodatkową asymetrię na internukleotydowym atomie fosforu. Zastosowanie którejkolwiek z wymienionych metod prowadzi do mieszaniny diastereoizomerów, która może być rozdzielona na poszczególne komponenty za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) tylko w przypadku krótkich oligomerów ($n \leq 3$) [24].

Do stereokontrolowanej syntezy homochiralnych oligotiofosforanów deoksyrybonukleozydów można wykorzystać enzymy z grupy polimeraz DNA, które w odpowiednich warunkach, na matrycy jednoniciowego kwasu nukleinowego, w obecności 5'-O- α -tiotrifosforanów wszystkich czterech deoksyrybonukleozydów, katalizują tworzenie komplementarnej nici tiofosforanowej o konfiguracji R na każdym internukleotydowym atomie fosforu [23].

Chemiczna metoda stereokontrolowanej syntezy oligotiofosforanów nukleozydów o dowolnej sekwencji oraz zaplanowanej konfiguracji absolutnej na każdym centrum tiofosforanowym została zaproponowana przez Steca i współ. [33]. Jako substraty służą 3'-O- α -2-tio-1,3,2-oksatiafosfolany odpowiednio zablokowanych nukleozydów, które można chromatograficznie rozdzielić na diastereoizomery różniące się konfiguracją absolutną na atomie fosforu. Wykazuje, że diastereoizomerycznie czyste oksatiafosfolany reagują z grupą 5'-OH rosnącego łańcucha oligonukleotydowego w warunkach katalizy zasadowej (DBU), tworząc nowe internukleotydowe centrum tiofosforanowe o zdefiniowanej chiralności przy atomie fosforu. Reakcja przebiega z retencją konfiguracji [34], a zatem bardziej mobilny chromatograficznie oksatiafosfolan o konfiguracji S_p jest prekursorem centrum tiofosforanowego o konfiguracji S_p (rys. 10). Synteza na stałym nośniku wymaga zastosowania łącznika sarkozyнового, odpornego na obecność DBU.



Rys. 10. Stereokontrolowana synteza oligotiofosforanów deoksyrybonukleozydów. Przykład otrzymywania centrum o konfiguracji S_p .

2.4. Oligoditiofosforany nukleotydów

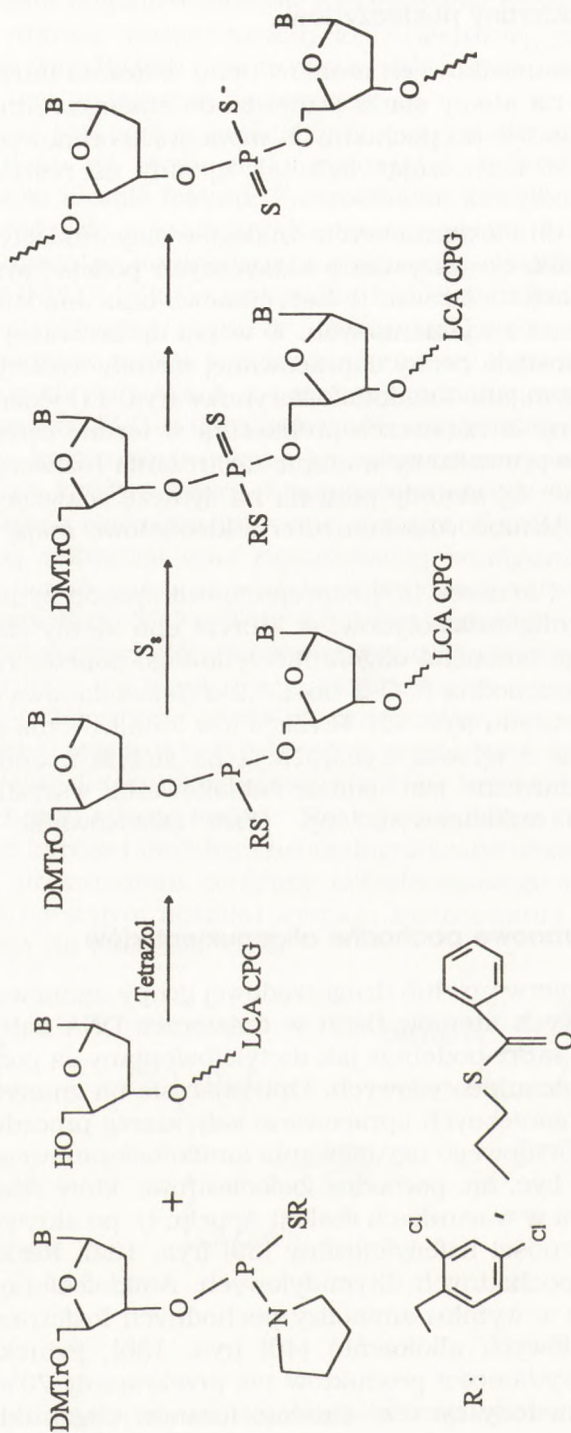
Zamiana obu niemostrkowych atomów tlenu wiązania internukleotydowego w cząsteczce DNA na atomy siarki prowadzi do analogów ditiofosforanowych, które w przeciwieństwie do pochodnych monotiofosforanowych nie posiadają centrum chiralności zachowując ładunek ujemny na resztach internukleotydowych.

Do otrzymania ditiofosforanowych analogów oligonukleotydów próbowano wykorzystać modyfikacje wszystkich klasycznych podejść syntetycznych, takich jak: metoda fosfortriestrowa, H-fosfonianowa oraz amidofosforynowa [35], jednak tylko ostatnia z wymienionych, w wersji opracowanej w laboratorium Caruthersa [36], posiada cechy dopracowanej metody syntetycznej. W podejściu tym, określanym jako amidotiofosforynowe (rys. 11) jeden z atomów siarki jest wprowadzany w cząsteczce prekursora w formie estru tiolowego, natomiast drugi jest wprowadzany w etapie usiarczania roztworem elementarnej siarki. Zastosowanie tej metody pozwala na syntezę sekwencji „mieszanych”, w których tylko wybrane wiązania internukleotydowe mają strukturę ditiofosforanową.

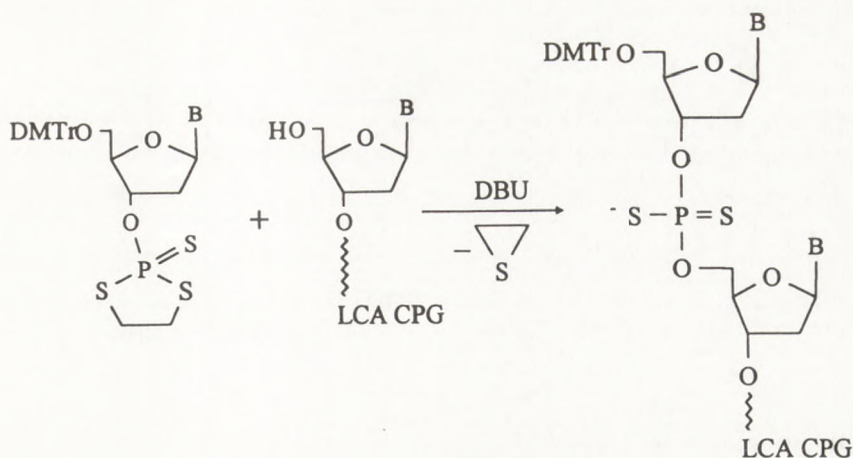
Ostatnio Stec i Okruszek [37] zaproponowali sposób syntezy ditiofosforanowych analogów oligonukleotydów, w którym oba atomy siarki są wprowadzane do rosnącego łańcucha oligonukleotydowego poprzez reakcję terminalnej grupy 5'-OH z pochodną 3'-O-2-tio-1,3,2-ditiafosforanową odpowiednio zablokowanego nukleozydu (rys. 12). Reakcja jest katalizowana przez DBU i może być zrealizowana z wysoką wydajnością na stałym nośniku z łącznikiem sarkozynowym. Konieczne jest jednak zablokowanie wszystkich aktywnych funkcji NH zasad nukleinowych, np. przez zastosowanie grup amidynowych [38].

2.5. Amidofosforanowe pochodne oligonukleotydów

Wprowadzenie pierwszo- lub drugorzędowej grupy aminowej w miejsce jednego z niemostrkowych atomów tlenu w cząsteczce DNA daje tzw. pochodne amidofosforanowe, które podobnie jak metylofosfoniany są pozbawione ładunku na grupach internukleotydowych. Opierając się na znanych przemianach związków fosforoorganicznych opracowano cały szereg procedur służących do syntezy internukleotydowego ugrupowania amidofosforanowego (rys. 13). Punktem wyjścia mogą być, np. pochodne fosfodiestrowe, które reagują z pierwszorzędnymi aminami w warunkach reakcji Appela, tj. po aktywacji czterochlorkiem węgla w obecności trifenylofosfiny [39] (rys. 13a). Reakcję tę wykorzystano do syntezy pochodnych ditymidylowych. Amidofosforany nukleotydów otrzymano również w wyniku aminolizy pochodnych fosfortriestrowych za pomocą pierwszorzędnymi alkiloamin [40] (rys. 13b), jednak, podobnie jak w reakcji Appela, wydajności produktów nie przekraczały 70%. Bardziej obiecująco wyglądają metody syntezy amidofosforanów oligonukleotydów oparte na reakcjach utlenienia pochodnych H-fosfonianowych bądź fosforynowych



Rys. 11. Amidotiofosforynowa metoda syntezy oligoditiofosforanów nukleozydów.

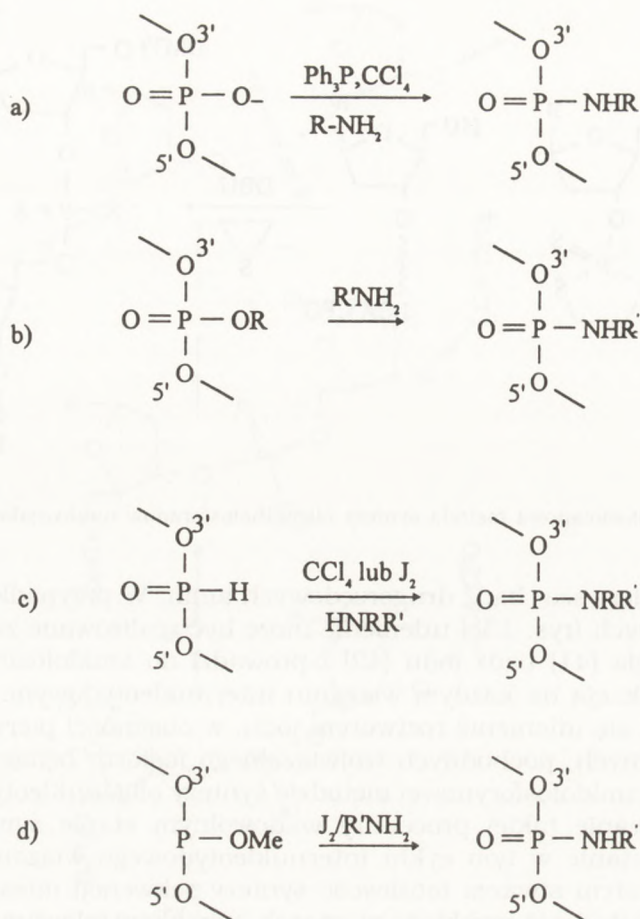


Rys. 12. Ditiafosfolanowa metoda syntezy oligoditiofosforanów nukleozydów.

w obecności pierwszo- bądź drugorzędowych amin. W przypadku pochodnych H-fosfonianowych (rys. 13c) utlenienie może być realizowane za pomocą czterochlorku węgla [41] bądź jodu [42] i prowadzi do amidofosforanów z identyczną modyfikacją na każdym wiązaniu internukleotydom. Bardziej atrakcyjne wydaje się utlenienie roztworem jodu, w obecności pierwszorzędowych amin alifatycznych, pochodnych trójwiązalnego fosforu, będących związkami pośrednimi w amidofosforanowej metodzie syntezy oligonukleotydów (rys. 13d) [43]. Zastosowanie takiej procedury w dowolnym etapie syntezy powoduje wówczas powstanie w tym cyklu internukleotydom wiązania amidofosforanowego, a zatem stwarza możliwość syntezy sekwencji mieszanych. Żadna z opisanych metod nie przebiega w sposób stereokontrolowany i w rezultacie powstaje mieszanina wszystkich możliwych diastereoizomerów wynikających z chiralności każdego tworzącego się centrum amidofosforanowego.

2.6. Fosfortriestrowe pochodne oligonukleotydów

Pochodne fosfortriestrowe, zawierające internukleotydom ugrupowania $P(O)OR$, podobnie jak amidofosforany oraz metylofosfoniany, charakteryzują się brakiem ujemnego ładunku oraz wprowadzeniem dodatkowych elementów chiralności. Z punktu widzenia syntezy pochodne fosfortriestrowe stanowią kluczowe produkty pośrednie w metodzie amidofosforanowej (rys. 1) oraz fosfortriestrowej (rys. 3) jako łatwo usuwalna osłona grupy fosforanowej (estry metylowe, β -cyjanoetylowe, aryłowe). Wysoka labilność tych estrów sprawia, że praktyczne znaczenie uzyskały fosfortriestry trwale w warunkach postsyntezy obróbki roztworem amoniaku — najczęściej estry etylowe oraz izopropylowe [44]. Zastosowanie zatem w danym cyklu syntetycznym metody



Rys. 13. Reakcje prowadzące do wytworzenia internukleotydu wiązania amidofosforanowego.

amidofosforanowej (rys. 1) odpowiedniej pochodnej amidofosforanowej ($\text{R}=\text{Et}$ lub $i\text{-Pr}$) prowadzi do powstania centrum fosfortriestrowego, które pozostaje nienaruszone w warunkach kontrolowanej amonolizy (25% NH_4OH , 48 godzin, temp. pokojowa), wystarczających do odcięcia oligonukleotydów ze złoża, odblokowania zasad nukleinowych oraz hydrolizy labilnych estrów metylowych bądź β -cyanoetylowych. Możliwe jest zatem na tej drodze otrzymanie oligofosfortriestrowych nukleozydów oraz sekwencji mieszanych, zawierających funkcje fosfortriestrowe w wybranych miejscach łańcucha oligonukleotydu [44].

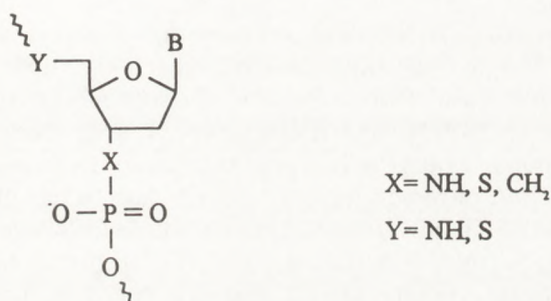
Stereokontrolowana synteza oligofosfortriestrowych nukleozydów nie została dotąd opracowana. Oligonukleotydy zawierające pojedyncze centra fosfortriestrowe rozdzielono na indywidualne diastereoizomery metodą HPLC [45],

a konfiguracja absolutna na atomie fosforu została określona drogą korelacji stereochemicznej [44].

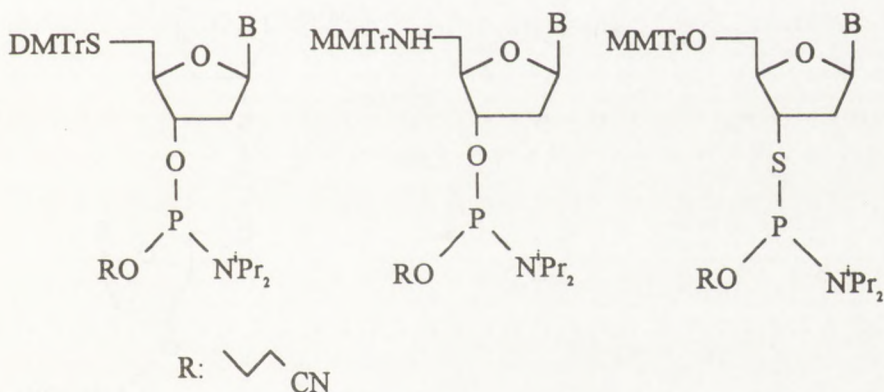
2.7. Modyfikacje w pozycji mostkowej wiązania internukleotydowego

Poza opisanymi analogami oligonukleotydów, w których jeden z niemostkowych atomów tlenu jest zastąpiony inną grupą, syntetyzowano także analogi zawierające w miejscu jednego z mostkowych atomów tlenu atom siarki, grupę NH bądź grupę metylową (rys. 14). Taka modyfikacja pozwala zachować ładunek ujemny oraz nie powoduje chiralności grupy fosforanowej. Synteza takich połączeń może się odbywać metodą amidofosforynową z zastosowaniem substratów zawierających modyfikację amidową [46] bądź tiolową [47] przedstawionych na rys. 15.

Analogi 5'-amidowe mogą być również syntetyzowane metodą enzymatyczną (polimeraza DNA) z użyciem odpowiednich trifosforanów 5'-amino-5'-deoksynukleozydów [48], natomiast pochodne 3'-amidowe poprzez polikondensację aktywnych fosforanów 3'-amino-3'-deoksynukleozydów [49].



Rys. 14. Modyfikacje w pozycji mostkowej.



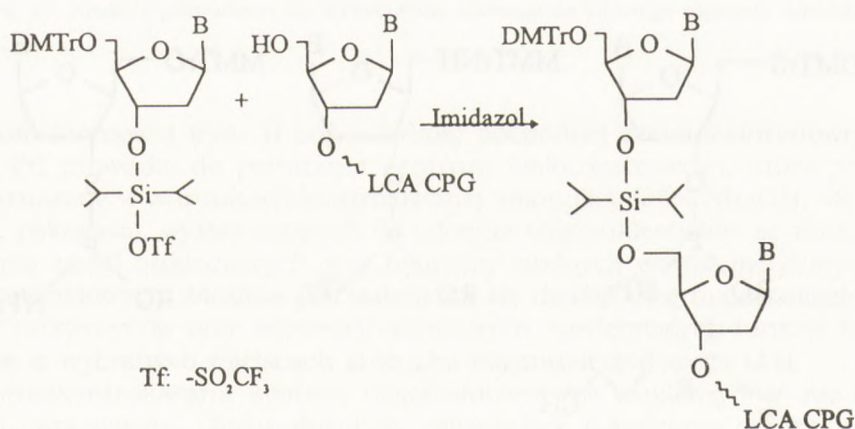
Rys. 15. Komponenty do amidofosforynowej syntezy „mostkowych” analogów oligonukleotydów.

3. Analogi oligonukleotydów nie zawierające fosforu w grupie internukleotydydowej

Zastąpienie internukleotydydowej reszty fosforanowej ugrupowaniem nie zawierającym atomu fosforu było od dawna przedmiotem poszukiwań wielu chemików. Zsyntetyzowane analogi oligonukleotydów zazwyczaj pozbawione są ładunku ujemnego na centrum internukleotydydowym. Podstawowym jednak problemem było takie dobranie długości i konformacji grupy internukleotydydowej, aby zachować zbliżone do naturalnych odległości pomiędzy zasadami nukleinowymi, co stanowi warunek konieczny dla zachowania właściwości asocjacyjnych takich połączeń. W niektórych analogach odpowiednie odstępstwa pomiędzy zasadami nukleinowymi oraz właściwą konformację łańcucha uzyskano pomijając cząsteczki deoksyrybozy w strukturze oligomeru.

3.1. Pochodne siloksanowe

W połączeniach takich grupy fosforanowe są zastąpione resztami siloksanowymi $-\text{OSi}(\text{R}_2)\text{O}-$. Związki te otrzymuje się na stałym nośniku wykorzystując aktywne 3'-O-dialkylsililotrifluorometanosulfonowe pochodne nukleotydów (rys. 16) [50]. Aby uzyskać niezbędną selektywność przemian jako pozostałe podstawniki przy atomie krzemu stosuje się grupy izopropylowe. Oligomery są silnie hydrofobowe i nierozpuszczalne w wodzie. Otrzymano również rozpuszczalne w wodzie sekwencje mieszane, zawierające pojedyncze złącza siloksanowe w określonych miejscach łańcucha oligonukleotydydowego, przez zastosowanie blokowanego dimeru siloksanowego, zawierającego na końcu 3' funkcję amidofosforynową (rys. 17). Segment taki może być wykorzystany do syntezy chimerycznych oligonukleotydów fosfodiesterowo-siloksanowych klasyczną metodą amidofosforynową [50].



Rys. 16. Synteza siloksanowych analogów oligonukleotydów.

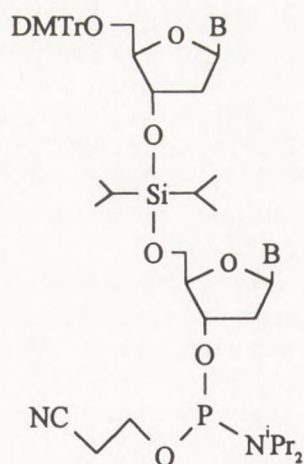
3.2. Połączenia zawierające elementy struktury kwasów karboksylowych w łączniku internukleotydydowym

W poszukiwaniu optymalnego łącznika reszt nukleozydowych, który pozwoliłby na otrzymanie oligomerów posiadających dobre właściwości asocjacyjne oraz zwiększoną hydrofilowość, zsyntetyzowano również szereg pochodnych posiadających jako łączniki łańcuchy alifatyczne zawierające elementy struktury kwasów karboksylowych, takie jak: **reszty karboksymetylenowe, węglanowe, karbaminianowe** oraz **acetamidowe** (rys. 18).

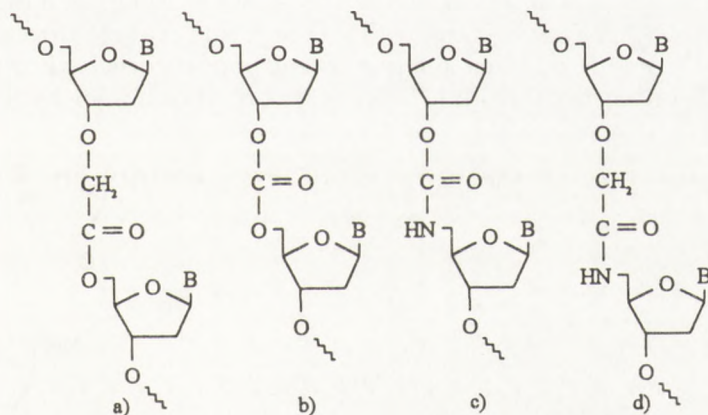
Oligomery zawierające reszty nukleozydowe połączone mostkami **karboksymetylenowymi** zostały otrzymane przez Jonesa [51] w wyniku polimeryzacji 3'-O-karboksymetylenowej pochodnej nukleozydu wobec dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) w roztworze pirydynowym (rys. 19).

Próby syntezy pochodnych karboksymetylenowych przez kontrolowane przyłączenie kolejnych blokowanych monomerów zakończyły się tylko częściowym powodzeniem z uwagi na nietrwałość ugrupowania karboksyes-trowego w środowisku zasadowym [51].

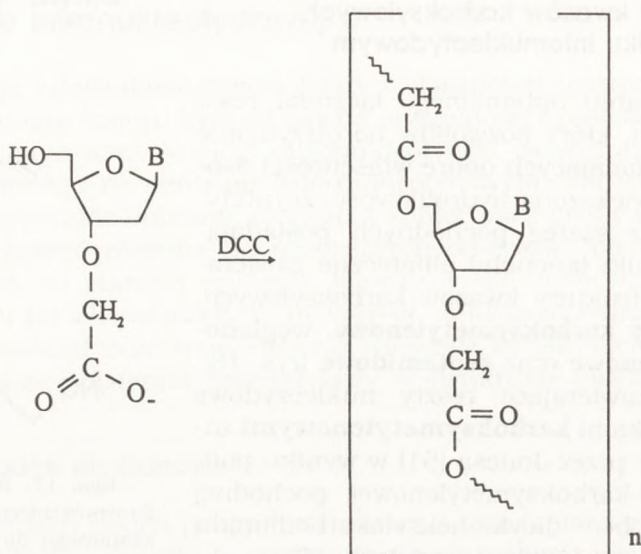
Łączniki **węglanowe**, z uwagi na niezwykłą podatność na hydrolizę znalazły bardzo ograniczone zastosowanie i nie udało się nimi połączyć więcej niż trzy jednostki nukleozydowe [52]. Jako czynniki kondensujące używany był fosgen oraz aktywne estry węglanowe [52].



Rys. 17. Blokowany dimer do wprowadzenia wiązania siloksanowego do mieszanych sekwencji fosfodiesterowo-siloksanowych.



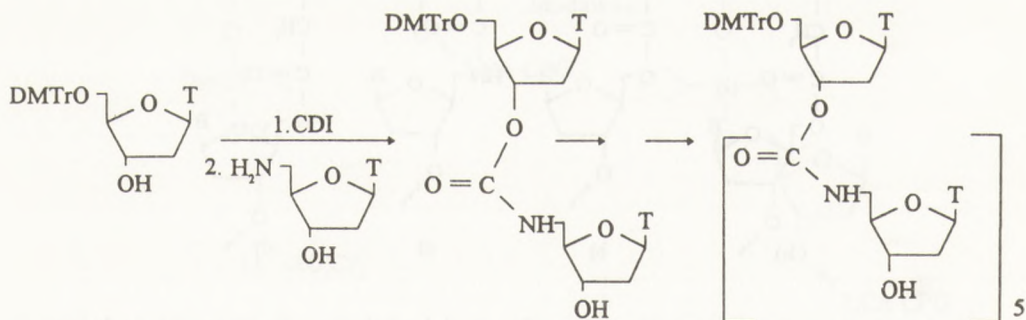
Rys. 18. Analogi oligonukleotydów z łącznikiem: a) karboksymetylenowym, b) węglanowym, c) karbaminianowym, d) acetamidowym.



Rys. 19. Polimeryzacja 3'-O-karboksymetylenowych pochodnych nukleozydów.

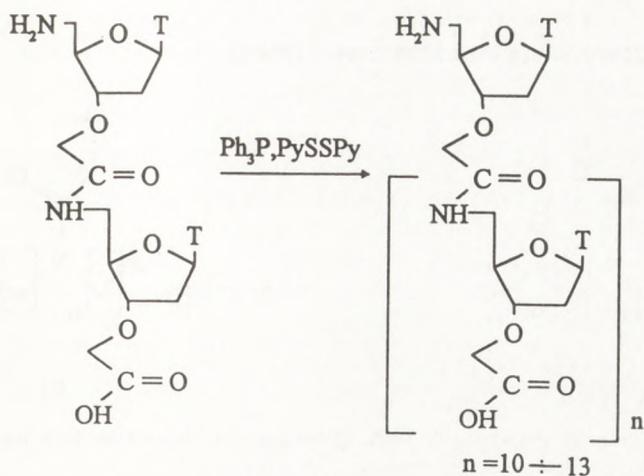
Łączniki **karbaminianowe** posiadają z założenia większą odporność na hydrolizę w dość szerokim zakresie pH. Stosując karbonylodiimidazol (CDI) jako synton karbonylowy oraz odpowiednio blokowane nukleozydy uzyskano heksamer tymidylowy (rys. 20) [53], który jednak obok słabej rozpuszczalności w wodzie miał właściwość silnego wiązania się do powierzchni szklanych.

Łączniki **acetamidowe** powinny mieć większą trwałość na hydrolizę oraz zwiększoną hydrofilowość. Ich synteza poprzez polimeryzację odpowiednich monomerów napotykała jednak na szereg trudności z uwagi na silną tendencję do tworzenia cyklicznych laktamów [54] oraz liczne reakcje uboczne. Problem rozwiązano dopiero poprzez polimeryzację odpowiednich dimerów (rys. 21) [55]. Polimery nie miały jednak oczekiwanych właściwości hybrydyzacyj-



Rys. 20. Synteza heksameru z łącznikiem karbaminianowym.

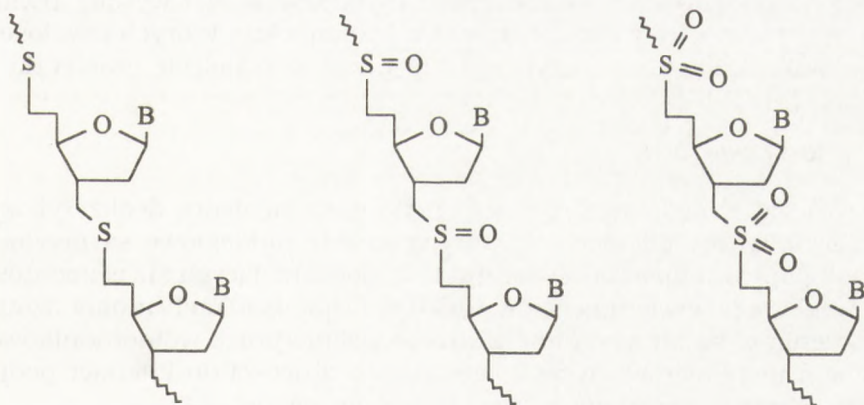
nych oraz trwałości, wykazując za to silne powinowactwo do powierzchni szklanych i plastikowych.



Rys. 21. Polimeryzacja dimeru z łącznikiem acetamidowym.

3.3. Połączenia zawierające siarkę w łączniku internukleotydowym

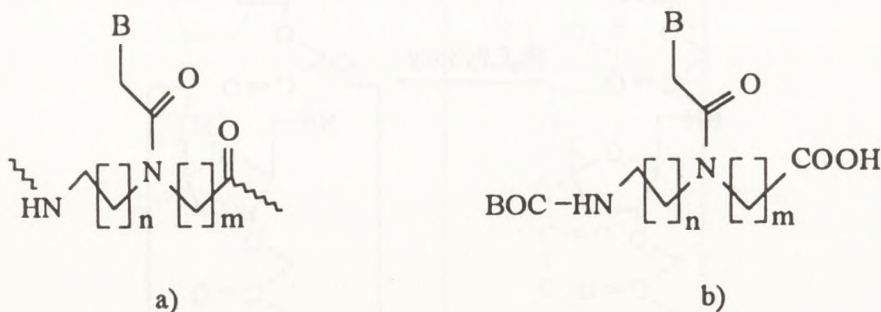
Warunek zwiększonej hydrofilowości i odpowiedniego dystansu pomiędzy jednostkami nukleozydowymi można również uzyskać poprzez połączenie elementów nukleozydowych, nie zawierających atomów tlenu 3' i 5', mostkami zawierającymi dwie grupy metylenowe oraz atom siarki na różnym stopniu utlenienia (rys. 22). Synteza monomerów oraz sposób ich łączenia w struktury oligomeryczne o strukturze już podanej przez Bennera [56]. Opisano również otrzymywanie blokowanych syntonów, pozwalających na włączanie w dowol-



Rys. 22. Oligomery zawierające siarkę w mostku „internukleotydowym”.

nym miejscu łańcucha oligonukleotydu podjednostek dinukleozydowych, zawierających w łączniku wiążącym nukleozydy ugrupowanie sulfonianowe [57], sulfonamidowe [57], sulfaminianowe [58] oraz tioformacetalowe [59].

3.4. „Peptydowe kwasy nukleinowe” (PNA)



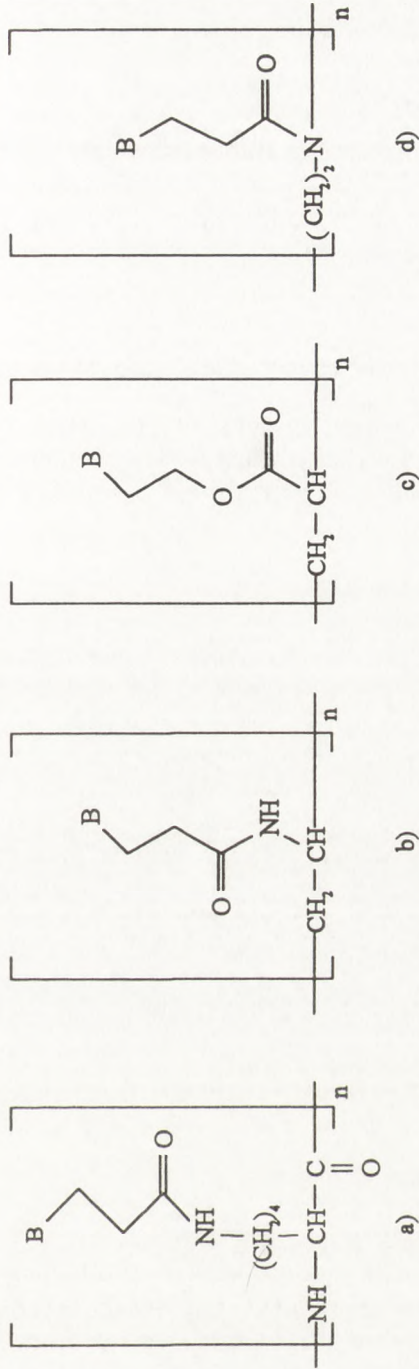
Rys. 23. a) Jednostki strukturalne PNA. b) Monomery do syntezy PNA metodą Merrifielda.
 $n=m=1$; 2-aminoetyloglicynowa jednostka PNA (g);
 $n=1, m=2$; 2-aminoetylo- β -alaninowa jednostka PNA (β);
 $n=2, m=1$; 3-aminopropyloglicynowa jednostka PNA (apg).

W ostatnim czasie w laboratoriach duńskich zaprojektowano poprzez modelowanie komputerowe i wykonano syntezę związków, posiadających długi łańcuch zawierający połączone wiązaniami peptydowymi reszty 2-aminoetyloglicyny (g), 2-aminoetylo- β -alaniny (β) lub 3-aminopropyloglicyny (apg), w których zasady nukleinowe są przyłączone kowalencyjnie do „aminowego” atomu azotu poprzez mostki metylenokarbonylowe (rys. 23a) [60]. Połączenia te, określane jako „peptydowe kwasy nukleinowe” (PNA) zostały zsyntetyzowane standardową metodą syntezy peptydów na stałym nośniku, opracowaną oryginalnie przez Merrifielda, z użyciem substratów przedstawionych na rys. 23b [60]. Cząsteczki PNA są obdarzone hydrofilowością i wysoką trwałością chemiczną oraz tworzą z cząsteczkami DNA kompleksy, których trwałość można regulować liczbą grup metylenowych (m, n) w szkieletie cząsteczki [61].

3.5. „Plastikowe DNA”

Inny rodzaj modyfikacji, również eliminujący elementy deoksyrybozy, zawierają syntetyczne polimery, w których zasady nukleinowe są przyłączone, zazwyczaj poprzez odpowiednie łączniki, do powtarzających się elementów łańcucha węglowego zawierającego w niektórych przypadkach atomy azotu.

Połączenia te są otrzymywane w drodze polimeryzacji wolnorodnikowej odpowiednich monomerów, tworząc łańcuchy o długości do kilkuset podjednostek [62]. Typowe przykłady są przedstawione na rys. 24.



Rys. 24. Przykłady „plastikowego DNA”.
 Pochodne: a) polilizynowe, b) polimetakrylamidowe, c) polimetakryloksyetylowe, d) polietylenoiminowe.

4. Oligodeoksyrybonukleotydy zawierające modyfikowaną jednostkę nukleozydową

4.1. Oligonukleotydy α

W ten sposób określa się oligonukleotydy, w których w miejsce naturalnych nukleozydów wbudowane są nukleozydy zawierające deoksyrybozę w anomerycznej formie α (nukleozydy α). Metody syntezy takich oligonukleotydów nie różnią się zasadniczo od metod stosowanych dla normalnych oligodeoksyrybonukleotydów [63].

4.2. Oligonukleotydy zawierające modyfikowane zasady nukleinowe

Najczęściej stosowaną modyfikacją tego typu jest wbudowanie reszt deoksyinozyny w łańcuch oligonukleotydowy. Oligonukleotydy takie syntetyzuje się klasycznymi metodami opisanymi w rozdz. 2.1.

5. Oligorybonukleotydy

Zasadniczą różnicę strukturalną, powodującą określone konsekwencje w podejściach do syntezy oligorybonukleotydów, jest obecność grupy 2'-OH, która musi być selektywnie chroniona w trakcie syntezy. Typowymi grupami blokującymi funkcje 2'-OH są wprowadzone przez Reese'a [64] grupy typu acetalowego (Ctmp, Fpmp), wprowadzona przez Ogilvie'go [65] grupa tert-butyłodimetylosililowa oraz fotolabilna grupa O-nitrobenzylowa [66].

Poza problemem ochrony grupy 2'-OH metody syntezy oligorybonukleotydów nie różnią się zasadniczo od metod opisanych w rozdz. 2.1.

Najczęściej stosowaną modyfikacją oligorybonukleotydów, powodującą znaczne zwiększenie odporności oligonukleotydów na nukleazy oraz polepszenie właściwości asocjacyjnych, jest trwale zablokowanie grupy 2'-OH poprzez wytworzenie eterów metylowych. 2'-O-metylooligorybonukleotydy syntetyzuje się metodami opisanymi w rozdz. 2.1., stosując monomery zawierające grupę 2'-OMe [67].

6. Podsumowanie

Nietrwałość w warunkach fizjologicznych oraz ograniczona przenikalność przez błony biologiczne oligodeoksyrybonukleotydów spowodowały, że dla celów zastosowania w strategii antysensowej zsyntetyzowano cały szereg ich analogów zawierających modyfikacje w internukleotydowych grupach fosfodiesterowych, fragmentach cukrowych i zasadach nukleinowych. Otrzymano również analogi oligonukleotydów, w których szkielet fosforanowo-cukrowy

zastąpiono zupełnie innym ugrupowaniem, zachowując odległości pomiędzy zasadami nukleinowymi umożliwiające tworzenie wiązań typu Watsona-Cricka z komplementarnym odcinkiem mRNA. Problem syntezy modyfikowanych oligonukleotydów stał się tym samym stymulatorem rozwoju syntezy organicznej w takich dziedzinach jak: chemia organicznych związków fosforu, krzemu i siarki, chemia pochodnych kwasów karboksylowych i aminokwasów oraz chemia polimerów. Opracowano szereg nowych grup osłaniających reaktywne funkcje aminowe i hydroksylowe nukleozydów oraz nowych odczynników pomocniczych (np. odczynników usiarczających). Wprowadzono również wiele udoskonaleń w zakresie syntezy na nośniku stałym z użyciem automatycznych syntetyzerów DNA.

Wprowadzenie elementu chiralności na internukleotydowych centrach fosforanowych w niektórych analogach oligonukleotydów dało impuls do poszukiwania metod stereokontrolowanej syntezy takich oligomerów. Metodyka opracowana dla otrzymywania stereoregularnych oligotiofosforanów oraz oligometylofosfonianów nukleozydów stanowi trwały wkład w rozwój współczesnej stereochemii.

Literatura

1. Zamecnik P., Stephenson M.L., (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 280.
2. Shaw J.P., Kent K., Bird J., Fishback J., Froehler B.F., (1991), Nucleic Acids Res., 19, 747.
3. Loke S.L., Stein C.A., Zhang X.H., Mori K., Nakanishi M., Subasinghe C., Cohen J.S., Neckers L.M., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3474.
4. Uhlmann E., Peyman A., (1990), Chem. Reviews, 90, 543.
5. *Oligonucleotides and analogues. A practical approach*, (1991), Ed. F. Eckstein, IRL Press, Oxford.
6. *Protocols for oligonucleotides and analogs. Synthesis and properties*, (1993), Ed. S. Agrawal, Humana Press, Totowa.
7. McBride L., Caruthers M., (1983), Tetrahedron Lett., 24, 245.
8. Letsinger R.L., Lunsford W.B., (1976), J. Am. Chem. Soc., 98, 3655.
9. Garegg P., Regberg T., Stawiński J., Strömberg R., (1986), Chem. Scr., 26, 59.
10. Froehler B., Ng P.G., Matteucci M., (1986), Nucleic Acids Res., 14, 5399.
11. Hall R.H., Todd A., Webb R.F., (1957), J. Chem. Soc., 3291.
12. *Oligonucleotide synthesis. A practical approach*, (1984), Ed. M.J. Gait, IRL Press, Oxford.
13. Miller P.S., Yano E., Carrol C., Jayaraman K., Ts'o P.O.P., (1979), Biochemistry, 18, 5134.
14. Agrawal K.L., Riftina F., (1979), Nucleic Acids Res., 6, 3009.
15. Miller P.S., Reddy M.P., Murakami A., Blake K.R., Lin S., Agris C.H., (1986), Biochemistry, 25, 5092.
16. Marugg J.E., de Vroom E., Dreef C.E., van der Marel G.A., van Boom J.H., (1986), Nucleic Acids Res., 14, 2171.
17. Löschner T., Engels J., (1988), Nucleosides & Nucleotides, 7, 729.
18. Stec W.J., Zon G., Egan W., Byrd R.A., Phillips L.R., Gallo K.A., (1985), J. Org. Chem., 50, 3908.
19. Agarwal K.L., Goodchild J., (1987), Tetrahedron Lett., 28, 3539.
20. Leśnikowski Z.J., Jaworska M., Stec W.J., (1990), Nucleic Acids Res., 18, 2109.

21. Jaworska-Maślanka M., Kacperczyk W., Korczyński D., Tanious F., Wilson W.D., Stec W.J., Leśnikowski Z.J. — (praca w przygotowaniu do druku).
22. Woźniak L.A., Pyzowski J., Wieczorek M.W., Stec W.J. — (praca w przygotowaniu do druku).
23. Eckstein F., (1985), *Annu. Rev. Biochem.*, 54, 367.
24. Stec W.J., Zon G., Egan W., Stec B., (1984), *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 6077.
25. Iyer R.P., Phillips L.R., Egan W., Regan J.B., Beaucage S.L., (1990), *J. Org. Chem.*, 55, 4693.
26. Vu H., Hirschbein B.L., (1991), *Tetrahedron Lett.*, 32, 3005.
27. Stec W.J., Uznański B., Wilk A., Hirschbein B.L., Fearon K.L., Bergot B.J., (1993), *Tetrahedron Lett.*, 34, 5317.
28. Stec W.J., Zon G., (1984), *Tetrahedron Lett.*, 25, 5275.
29. Matsukura M., Zon G., Shinozuka K., Stein C.A., Mitsuya H., Cohen J.S., Broder S., (1988), *Gene*, 72, 343.
30. Stawiński J., Thelin M., (1991), *J. Org. Chem.*, 56, 5169.
31. Kemal Ö., Reese C.B., Serafinowska H.T., (1983), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 591.
32. Marugg J.E., van den Bergh C., Tromp M., van der Marel G. A., van Zoest W.J., van Boom J.H., (1984), *Nucleic Acids Res.*, 12, 9095.
33. Stec W.J., Grajkowski A., Koziółkiewicz M., Uznański B., (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19, 5883.
34. Uznański B., Grajkowski A., Krzyżanowska B., Kaźmierkowska A., Stec W.J., Wieczorek M.W., Błaszczuk J., (1992), *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 10197.
35. Dahl O., (1991), *Sulfur Reports*, 11, 167.
36. Marshall W.S., Caruthers M.H., (1993), *Science*, 259, 1564.
37. Okruszek A., Sierzchała A., Sochacki M., Stec W.J., (1992), *Tetrahedron Lett.*, 33, 7585.
38. Okruszek A., Sierzchała A., Stec W.J. — (praca w przygotowaniu do druku).
39. Uznański B., Niewiarowski W., Stec W.J., (1982), *Tetrahedron Lett.*, 23, 4289.
40. Letsinger R.L., Bach S.A., Eadie J.S., (1986), *Nucleic Acids Res.*, 14, 3487.
41. Froehler B., Ng P., Matteucci M., (1988), *Nucleic Acids Res.*, 16, 4831.
42. Froehler B., (1986), *Tetrahedron Lett.*, 27, 5575.
43. Jäger A., Levy M., Hecht S.M., (1988), *Biochemistry*, 27, 7237.
44. Guga P., Koziółkiewicz M., Okruszek A., Uznański B., Stec W.J., (1987), *Nucleosides Nucleotides*, 6, 111.
45. Stec W.J., Zon G., Uznański B., (1985), *J. Chromatogr.*, 326, 263.
46. Bannwarth W., (1988), *Helv. Chim. Acta*, 71, 1517.
47. (a) Sproat B.S., Beijer B., Rider P., Neuner P., (1988), *Nucleosides Nucleotides*, 7, 651; (b) Cosstick R., Vyle J.S., (1989), *Tetrahedron Lett.*, 30, 4693.
48. Letsinger R.L., Wilkes J.S., Dumas L.B., (1976), *Biochemistry*, 15, 2910.
49. Shabarova Z.A., Ivanovskaya M.G., Isagutants M.G., (1983), *FEBS Lett.*, 154, 288.
50. Saha A.K., Sardaro M., Waychunas Ch., Delecki D., Kutny R., Cavanaugh P., Yawman A., Upson D.A., Kruse L.I., (1993), *J. Org. Chem.*, 58, 7827.
51. Bleaney R.C., Jones A.S., Walker R.T., (1975), *Nucleic Acids Res.*, 2, 699.
52. Tittensor J.R., (1971), *J. Chem. Soc. C.*, 2656.
53. Coull J.M., Carlson D., Weith H.L., (1987), *Tetrahedron Lett.*, 28, 745.
54. Gait M.J., Jones A.S., Walker R.T., (1974), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1684.
55. Gait M.J., Jones A.S., Shephard M.J., Walker R.T., (1979), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1389.
56. Huang Z., Schneider K.C., Benner S.A., (1991), *J. Org. Chem.*, 56, 3869.
57. Reynolds R.C., Crooks P.A., Maddry J.A., Shamin Akhtar M., Montgomery J.A., Secrist III J. A., (1992), *J. Org. Chem.*, 57, 2983.
58. Huie E.M., Kirshenbaum M.R., Trainor G.L., (1992), *J. Org. Chem.*, 57, 4569.
59. Jones R.J., Lin K.-Y., Milligan J.F., Wadwani S., Matteucci M.D., (1993), *J. Org. Chem.*, 58, 2983.

60. Hyrup B., Egholm M., Rolland M., Nielsen P.E., Berg R.H., Burchardt O., (1993), J. Chem. Soc., Chem. Commun., 518.
61. Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B., Nielsen P.E., (1993), Nature, 365, 566.
62. Inaki Y., (1987), Curr. Top. Polym. Sci., 1. 80.
63. Morvan F., Rayner B., Leonetti J.-P., Imbach J.-L., (1988), Nucleic Acids Res., 16, 833.
64. Rao T.S., Reese C.B., Serafinowska H.T., Takaku H., Zappa G., (1987), Tetrahedron Lett., 29, 577.
65. Ogilvie K.K., Usman N., Nicoghosian K., Cedergren R.J., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5764.
66. Tanaka T., Tamatsukuri S., Ikehara M., (1986), Nucleic Acids Res., 14, 6265.
67. Sproat B.S., Lamond A.I., Beijer B., Neuner P., Ryder U., (1989), Nucleic Acids Res., 17, 3373.

Methods of synthesis of modified oligonucleotides and their analogues — potential inhibitors of gene expression by ANTISENSE strategy

Summary

A review of current methods employed for the preparation of modified oligodeoksyribonucleotides and their analogues. The most typical analogues are represented including those with preserved phosphate-sugar skeleton and those containing no phosphorus in the "internucleotide" bridge and/or no sugar residue.

Key words:

modified oligonucleotides, chemical synthesis, antisense strategy.

Adres dla korespondencji:

Andrzej Okruszek, Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź.