



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Modifioidut nukleasiresistentit oligonukleotidit

Onni Jussila

Bio-orgaanisen kemian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

8.5.2024

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä(t): Onni Jussila

Otsikko: Modifioidut nukleasiresistentit oligonukleotidit

Ohjaaja(t): Mikko Ora

Sivumäärä: 13 sivua + liitteet 3 sivua

Päivämäärä: 8.5.2024

Synteettisillä oligonukleotideilla ja niiden rakenneanalogeilla on tärkeä rooli terapeuttisissa sovellutuksissa lääketieteessä. Luonnolliset oligonukleotidit ovat hyvin herkkiä hydrolysoitumaan elimistössä entsyymikatalyyttisesti. Toimiakseen terapeuttisina lääkeaineina oligonukleotideilla tulee olla riittävä kemiallinen ja entsyymaattinen pysyvyys. Oligonukleotidien biologista elinikää voidaan pidentää modifioimalla oligonukleotidin rakennetta korvaamalla oligonukleotidin fosfaattirunko erilaisilla sidoksilla tai ryhmillä. Modifikaatiot sokerirenkaassa ja nukleoemäksessä ovat myös mahdollisia.

LuK tutkielmassa tarkastellaan modifioitujen oligonukleotidien synteesejä keskittyen rikillä, seleenillä, tyrellä ja boorilla modifioituihin nukleosidien välisiin fosfodiesterisidoksiin. Fosforia sisältämättömissä oligonukleotideissa fosfodiesterisidos on korvattu esimerkiksi triatsoli- tai guanidiiniryhmillä. Perinteisesti modifioituja oligonukleotideja on syntetisoitu kiinteällä kantajalla fosforamidiittikemiaa hyödyntäen. Myyntiin hyväksytyistä terapeuttisista oligonukleotideista suurin osa on fosforotioaatteja. Koska fosforotioaatit esiintyvät kahtena diastereomeerina (S_P ja R_P), stereokontrolloitujen synteesismenetelmien kehitys onkin diastereomeerien erilaisten ominaisuuksien vuoksi yksi oleellinen tutkimusaihepiiri.

Synteesismenetelmien lisäksi tutkielmassa tarkastellaan modifioitujen oligonukleotidien nukleasiresistenssiä vertailemalla modifioitujen ja luonnollisten oligonukleotidien hydrolyysin puoliintumisaikoja nukleasien läsnäollessa. Myös kaksoiskierteiden pysyvyys on tarkastelun kohteena. Tulosten perusteella on voitu arvioida modifioidun oligonukleotidin soveltuvuutta antisense-oligonukleotidiksi.

Avainsanat: oligonukleotidi, nukleasiresistenssi, antisense-oligonukleotidi

Sisällysluettelo

1.	Johdanto	5
2.	Nukleaasit	6
3.	Fosforia sisältävät nukleosidien väliset sidokset	7
3.1.	Fosforotioaatit	8
3.2.	Fosforotiolaatit	10
3.3.	Fosforoselenaatit	12
3.4.	Fosforamidaatit	13
3.5.	Boranofosfaatit	14
4.	Fosforia sisältämättömät nukleosidien väliset sidokset	16
4.1.	Triatsolit	16
4.2.	Guanidiinit	17
5.	Johtopäätökset	17
6.	Viitteet	19

Lyhenneluettelo

AS	antisense
ASO	antisenseoligonukleotidi
CMV	sytomegalovirus
CSPDE	vasikan pernan fosfodiesteriäsi
DCA	dikloorietikkahappo
DCM	dikloorimetaani
DIEA	N, N-diisopropylietyyliamiini
DMTr	dimetoksitrietyyli
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (U.S. Food and Drug Administration)
MMTr	monometoksitrietyyli
NaOMe	natriummetoksidi
ODN	oligodeoksiribonukleotidi
PDE	fosfodiesteriäsi
SVPDE	käärmeen myrkyn fosfodiesteriäsi
TBAF	tetrabutyyliammoniumfluoridi
TBDPS	tert-butyylidifenyyliisilyyli
TEA	trietyyliamiini

1. Johdanto

Oligonukleotideilla ja niiden rakenneanalogeilla on tärkeä rooli monissa terapeuttisissa ja bioteknologisissa sovellutuksissa. Terapeuttiset oligonukleotidit voidaan jakaa toiminta/vaikutusperiaatteen perusteella esimerkiksi antisense- ja antigeeni-oligonukleotideihin sekä aptameereihin, siRNA- ja miRNA-molekyyleihin. Oligonukleotidien osuus lääkemarkkinoilla on lisääntymässä. Taulukossa 1 on esimerkkejä myyntiin hyväksytyistä terapeuttisista oligonukleotideista.

Taulukko 1. Esimerkkejä myyntiin hyväksytyistä terapeuttisista oligonukleotideista.

Yhdiste	Kemiallinen rakenne	FDA hyväksynyt	Sairaus	Yhtiö
Fomivirsen (Vitravene®)	PS	1998	CMV-retiniitti	Ionis Pharmaceuticals
Mipomersen (Kynamro®)	2'-OMoE-kimeeri ^a	2013	HoFH	Ionis Pharmaceuticals
Vutrisiran (Amvuttra®)	siRNA	2022	hATTR	Alnylam
Eplontersen (Wainua®)	PS	2023	ATTRv-PN	AstraZeneca/Ionis Pharmaceuticals

^a Oligonukleotideissa sytosiinit ovat 5-metyloituja. 5-Metylointi parantaa kaksoisjuosteen pysyvyyttä noin +0,5°C (T_m) jokaista Me-modifikaatiota kohden. [1]

Fomivirsen (Vitravene®) oli ensimmäinen markkinoille tullut terapeuttinen oligonukleotidi, jota Ionis Pharmaceuticals markkinoi vuonna 1998. [2] Tämä lääke on 21-meerinen fosforotioaattioligodeoksiribonukleotidi, jota on käytetty sytomegaloviruksen (CMV) aiheuttaman retiniitin hoidossa immuunipuutteisilla potilailla ja erityisesti potilailla, joilla on hankittu immuunikato-oireyhtymä eli AIDS. Mipomersen (Kynamro®) on toinen, vuonna 2013 FDA:n hyväksymä fosforotioaattioligonukleotidi (Kuva 1). Tämän lääkkeen on kehittänyt Ionis Pharmaceuticals ja Genzyme. [3] Toiminta perustuu kyseisen gapmeeri-oligonukleotidin kykyyn estää apolipoproteiini B:tä koodaavan lähettiaineen translaatio ja tätä kautta vähentää LDL-kolesterolin määrää potilailla.

2. Nukleaasit

Toimiakseen lääkkeenä terapeuttisen oligonukleotidin pitää täyttää monia vaatimuksia, joista eräs tärkeimmistä on riittävä kemiallinen ja entsyymattinen pysyvyys. Modifioimattomat oligonukleotidit ovat herkkiä hydrolysoitumaan soluissa entsyymikatalyyttisesti. Toimiakseen lääkkeenä oligonukleotidin rakennetta pitääkin modifioida. Modifikaatiosta huolimatta terapeuttisella oligonukleotidilla täytyy olla riittävän hyvä affiniteetti kohdeoligonukleotidiin.

Nukleaasit ovat hydrolaasiperheeseen kuuluvia entsyymejä, jotka hydrolysoivat nukleiinihappojen fosfodiesterisidoksia. Pilkkoutuminen tapahtuu joko P-O3'- tai P-O5-sidoksesta. Nukleaasit voidaan luokitella endonukleaaseihin ja eksonukleaaseihin riippuen siitä katkeako fosfodiesterisidos oligonukleotidijuosteen keskeltä vai ketjun päästä (kuva 1). Endonukleaasit koostuvat sekä DNAaseista ja RNAaseista, joiden substraatteina toimivat vastaavasti deoksiribonukleiinihappo ja ribonukleiinihappo. Näiden entsyymien toiminta voi olla joko epäspesifistä, jolloin ne voivat hydrolysoida kaikkia nukleiinihapposekvenssejä, tai sitten niiden toiminta voi olla hyvin spesifistä, jolloin ne hydrolysoivat vain tiettyjä fosfodiesterisidoksia substraatista (restriktioentsyymit).



Kuva 1. Eksonukleaasin ja endonukleaasin hydrolyysi. Mukailtu lähteestä. [4]

Fosfodiesteriaasit voivat hydrolysoida nukleosidien välisen fosfodiesterisidoksen lisäksi myös syklisen adenosiinimonofosfaatin (cAMP) ja guanosiinimonofosfaatin (cGMP), joilla on oleellinen rooli solunsisäisinä toisiohettimolekyyleinä signaloinnissa. Nykyään fosfodiesteriaasit onkin luokiteltu erilleen ekso- ja endonukleaaseista omaksi alaluokakseen, joka sisältää 11 erilaista ryhmää (PDE 1 - PDE 11) perustuen muun muassa kyseisten entsyymien cAMP- tai cGMP-affiniteetin, sijaintiin ja biologisiin toimintoihin.

Solunulkoisia fosfodiesteriaasi-entsyymejä (PDE) on esimerkiksi käärmeen myrkyissä ja ne toimivat eksonukleaaseina poistamalla nukleosidimonofosfaatteja polynukleotidiketjuista vaiheittain. PDE pystyy hajottamaan systemaattisesti kaikki luonnolliset ODN:t in vivo minuuteissa, jolloin 1–2 kbp:n pituisen DNA-pätkän puoliintumisaika voi olla useita tunteja. PDE:illä on erilaisia substraattispesifisyyksiä, kuten: DNA ja/tai RNA; 5',3'- tai 3',5'-

eksonukleasiaktiivisuus; yksijuosteisuus (ss) ja/tai kaksijuosteisuus (ds) ja terminaalinen OH-ryhmä tai terminaalinen fosfaattiryhmä. [5] Substraattispesifisyydellä kuvataan tässä sitä, kuinka selektiivinen PDE on tietyn tyyppisten molekyylien suhteen ja kuinka tehokkaasti se on vuorovaikutuksessa niiden kanssa. Taulukkoon 2 on esitetty tärkeimpiä tunnettuja fosfodiesteriaseja ja niiden aktiivisuuksia. Esimerkiksi RNAasi H:lla on oleellinen rooli antisense-strategiassa. RNAasi H pilkkoo lähetti-RNA:n (mRNA) katalyyttisesti ODN/mRNA-kaksoiskierteestä, jolloin DNA vapautuu ja sitoutuu toiseen mRNA-molekyyliin [5]. Kyseessä on RNA-interferenssi, mikä johtaa vastaavasti rajoittuneeseen proteiinisynteesiin tai geenin sammumiseen. Valitettavasti tunnetaan vain muutamia modifikaatioita, jotka indusoivat RNAasi-H:n aktiivisuutta. [5] Antisense-oligonukleotidia (ASO) suunniteltaessa on siis tärkeää valita rakenne, joka sallii RNAasi H:n hajottaa sen komplementaarisen kohde-RNA:n, samaan aikaan kun ASO:lla on korkea resistanssi muita nukleaseja vastaan.

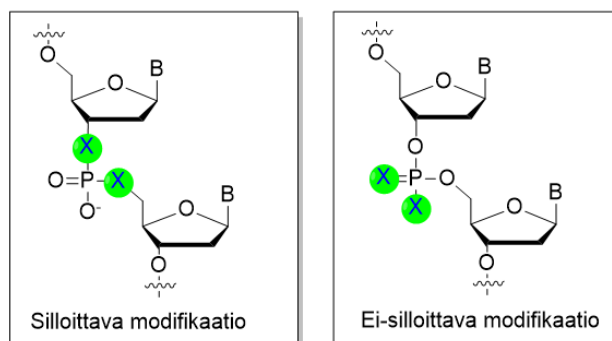
Taulukko 2. Muutamien tärkeimpien tunnettujen fosfodiesteriasejen nimet ja niiden aktiivisuudet. [4]

Fosfodiesteriase	Hydrolyyttiset toiminnot
	Eksonukleasiaktiivisuus
Fosfodiesteriase I käärmien myrkyin fosfodiesteriaseista (SVPDE)	5'-eksonukleasi, joka kohdistuu ss- tai ds-DNA:han tai RNA:han. 3' → 5' aktiivisuus
Vasikan pernan fosfodiesteriase (CSPDE)	3'-eksonukleasi, joka kohdistuu 5'-OH ss- tai ds-DNA:han tai RNA:han. 3' → 5' aktiivisuus
	Endonukleasiaktiivisuus
Nukleasi P1	3' → 5' aktiivisuus kohdistuu ss DNA:han tai RNA:han
RNAasi-H	Hydrolysoi hybridi-DNA/RNA-dupleksin RNA-juosteen

3. Fosforia sisältävät nukleosidien väliset sidokset

Kappaleessa 3 tarkastellaan modifioitujen oligonukleotidien synteesejä ja nukleasiresistenssiä. keskittyen oligomeerisiin rakenteisiin, joissa fosfodiesterisidoksen yksi happiatomi on korvattu rikillä, seleenillä, tyrellä tai boorilla. Muita fosfodiesterimodifioituja oligonukleotideja, joilla on tutkittu nukleasiresistenssiä, ovat erilaiset alkyylifosfonaatit, triesterit ja difosfaattidiesterit.

Fosfodiesterisidoksen happiatomin korvaaminen jollain toisella atomilla voidaan suorittaa joko silloittavassa asemassa (O3' ja O5') tai ei-silloittavassa asemassa, jolloin substituutio johtaa diastereomeerien seoksen muodostumiseen (kuva 2).



Kuva 2. Fosfodiesterisidosten siloittavat ja ei-siloittavat modifikaatiot.

3.1. Fosforotioaatit

Fosforotioaatit, joissa yksi ei-silloittavista fosfaatin happiatomeista on korvattu rikkiatomilla kuuluvat antisense-oligonukleotidien (ASO) ensimmäiseen sukupolveen. Antisense-oligonukleotidit ovat synteettisesti valmistettuja yksijuosteisia oligonukleotideja, jotka koostuvat 18–21 emäksestä ollen komplementaarisia kohdegeenin mRNA-sekvenssille. [6] Antisense-strategiassa fosforotioaattioligonukleotidit (PS-ODN) muodostavat lähetti-RNA:n kanssa kaksoiskierteitä, jotka ovat RNAasi H:n substraatteja, jolloin geenin ilmeneminen estyy.

Stec työryhmineen raportoi automatisoidun PS-ODN:n synteesin kiinteällä kantajalla fosforamidiittikemiaa käyttäen. Synteesissä muodostunut fosfiitti sulfuroitiin tiofosfaatiksi alkuainerikillä (S8). [7] Vaihtoehtona alkuainerikille on käytetty myös 3H-1,2-bentsoditioli-3-oni-1,1-dioksidia (Beaucage-reagenssi). [8] Tiosubstituution aikaansaaman nukleasiresistenssin vuoksi fosforotioaatit ovat erityisen mielenkiinnon kohteena lukuisissa sovelluksissa kehitettäessä terapeuttisia oligonukleotideja.

Monia työryhmineen on käyttänyt 17-meerisiä fosforotioaattioligonukleotideja tutkiessaan nukleasiresistenssiä ja antisense-aktiivisuutta kasvattamalla tiofosfodiesterisidosten lukumäärä oligonukleotideissa. Kohteena tutkimuksessa käytettiin ihmisen Ha-ras geeniä. [9] Tämä geeni kuuluu RAS-onkogeenien perheeseen, joihin kuuluvat geenit ovat osallisina solujen ja erilaistumisen säätelyssä. Onkogeenit voivat myös aiheuttaa syöpää, kun ne muuttuvat aktiivisiksi tai toimivat epänormaalisti. Taulukossa 3 on esimerkkejä fosforotioaattioligonukleotidien puoliintumisajoista ja antisense-aktiivisuudesta. Antisensi-

toiminnalla (AS) tarkoitetaan Ha-ras-mRNA:n ilmentymisen estymistä RNAasi-H:n aktivoituessa solun sisällä ODN:n konsentraation ollessa 0,1 μ M. [9]

Taulukko 3. PS-ODN:n puoliintumisajat Bal31-endonukleaasien läsnäollessa ja antisense aktiivisuus viljellyissä T24-soluissa. [9]

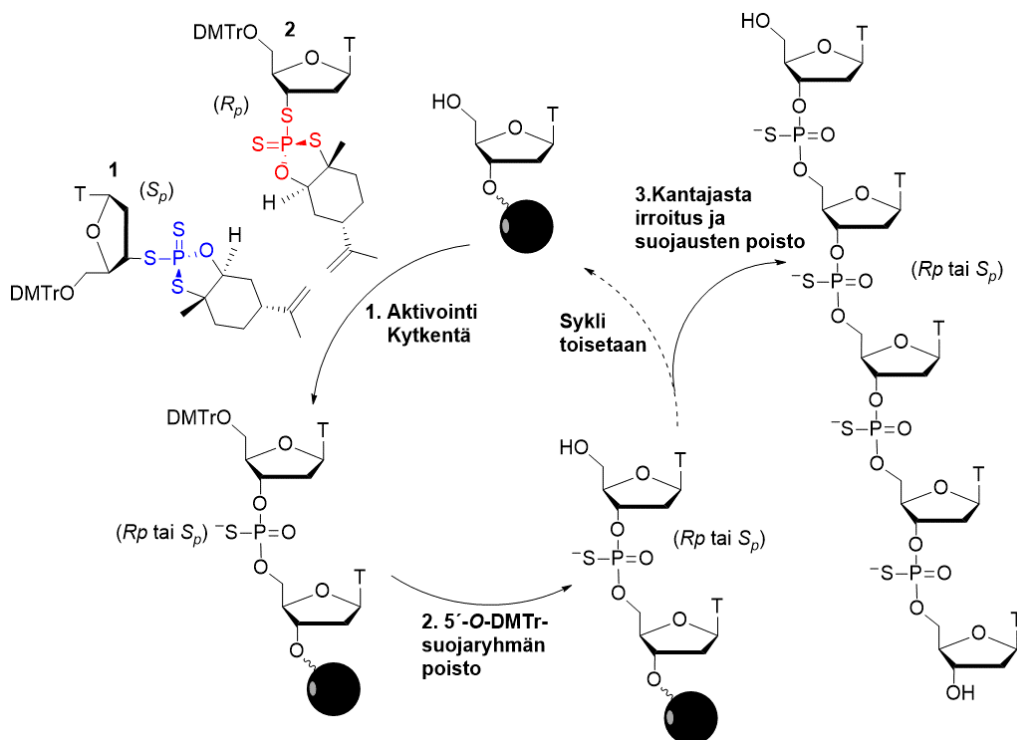
ODN (5' \rightarrow 3') ^a	t _{1/2} (min)	AS-toiminta (%)
d(CCACACCGACGGCGCCC)	5	0
d(C _{PS} C _{PS} A _{PS} C _{PS} A _{PS} C _{PS} C-GACG _{PS} G _{PS} C _{PS} G _{PS} C _{PS} C _{PS} C)	8	35
d(C _{PS} C _{PS} A _{PS} C _{PS} A _{PS} C _{PS} C _{PS} -GAC _{PS} G _{PS} G _{PS} C _{PS} G _{PS} C _{PS} C _{PS} C)	50	78
[d(CCACACCGACGGCGCCC)]-all-PS	>50	82

^a all-PS = kaikki ovat tiofosfodiesterisidoksia

Tutkimuksen tuloksista havaitaan selvää nukleaasiresistenssin ja antisense-toiminnan kasvua, mitä suurempi on tiofosfodiesterisidosten lukumäärä. 2'-Alkoksi- ja 2'-fluorimodifioituilla oligonukleotideilla RNAasi-H:n ei havaittu aktivoituvan in vitro, mutta tämä ongelma saatiin ratkaistua käyttämällä kimeerisiä oligonukleotideja, joissa modifioidut nukleotidit olivat vain juosteiden päissä. [10]

Koska fosforotioaatit esiintyvät kahtena diastereomeerina (*S_P* ja *R_P*), kiraalisuuden vaikutus nukleaasiresistenssiin on ollut kiinnostuksen kohteena. Useat Stecin ryhmän suorittamat tutkimukset keskittyivät PS-ODN:ien P-kiraalisuuden vaikutukseen niiden nukleaasiresistenttyyteen verrattuna luonnollisiin ODN:iin. Diastereomeerisesti puhtaiden 5'-O-DMTr-3'-O-(2-tio-1,3,2-oksatiafosfolaani)-nukleosidirakennusyksiköiden käyttö fosforotioaattien valmistuksessa on mahdollistanut stereokontrolloidut synteetit. [11] Stereokontrolloitujen synteesimenetelmien kehitys onkin diastereomeerien erilaisten ominaisuuksien vuoksi yksi oleellinen tutkimusaihepiiri. Useita PS-ODN:n stereokontrolloituja synteesimenetelmiä on kehitetty. [12]-[18]

Baran työryhmineen [19] on raportoinut stereokontrolloidun PS-ODN-synteesimenetelmän käyttämällä P(V)-kemiaa. Synteesi perustuu kiinteällä kantajalla suoritettavaan synteesimenetelmään, jossa kasvavaan oligonukleotidiketjuun liitetään (+ ja -)- ψ -aktivoituja nukleosideja **1** ja **2** (kaavio 1). PSI-reagenssit on syntetisoitu (+/-) -limoneenista. *R_P* tuote saadaan syntetisoitua valitsemalla (+) - ψ -reagenssi ja vastaavasti *S_P* tuote saadaan syntetisoitua valitsemalla (-) - ψ -reagenssi.

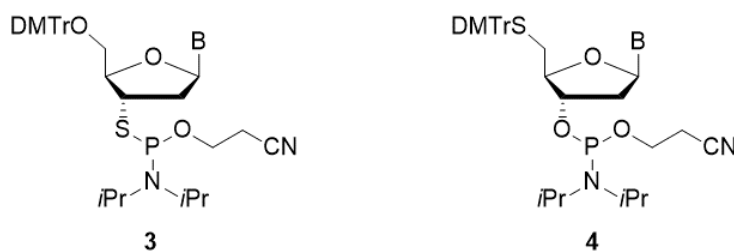


Kaavio 1. Stereokontrolloitu fosforotioaattisynteesi.

3.2. Fosforotiolaatit

Letsinger [20] on käyttänyt templaattivusteista kemiallista ligaatiota syntetisoidessaan 5'-fosforotiolaattioligonukleotidin. Synteesimenetelmässä käytettiin oligonukleotidia, jonka 3'-päässä on bromiasetyyliryhmä sekä tiosfosfaattiosa toisen olidonukleotidinketjun 5'-päässä. Näiden juosteiden konjugaatio tapahtui vesiliuoksessa spontaanisti komplementaarisen oligonukleotidin läsnäollessa. [21] Myös jodia on käytetty toisen oligonukleotidipuolijuosteen 3'-päässä. Jodin liittäminen suoritettiin käsittelemällä vapaa 5'-hydroksyyli-ryhmä Moffatin reagenssilla. [22] Nukleasiresistenssiä testattiin T4 DNA polymeraasin, SVPDE:n ja CSPDE:n läsnäollessa. Fosforotiolaatti hydrolysoitui 5–10 kertaa hitaammin kuin vastaava modifioimaton oligonukleotidi T4 DNA polymeraasin läsnäollessa. CSPDE:n läsnäollessa havaittiin myös hydrolyysin hidastumista modifioidulla sidoksella. Resistenssissä ei havaittu muutoksia SVPDE:n läsnäollessa. [23]

Duschmale työryhmineen on syntetisoinut LNA-gapmeerejä, jotka sisältävät 3'S- ja 5'S-fosfodiesterisidoksia. Synteesi suoritettiin kiinteällä kantajalla käyttäen sopivasti suojattua 5'-O-dimetoksitriityli-2'-deoksiribonukleosiditiofosforamidiittia (**3**) ja 5'-S-dimetoksitriityli-suojattua nukleosidifosforamidiittia (**4**) rakennusyksiköinä (kuva 3). [24]



Kuva 3. Fosforamidiitti rakennusyksiköitä.

Pyrimidiininukleosidi-3'-S-fosforamidiitit valmistettiin anhydro-nukleosidien kautta ja puriininukleosidien tapauksessa käytettiin Mitsunobu reaktiota. 5'-S-deoksiribo-3'-O-fosforamidiitit valmistettiin mesyloimalla tymidiinin 5'-asema, jota seurasi käsittely dimetoksitriityylitio-asetaatilla (DMTrSAc) natriummetoksidin (NaOMe) läsnäollessa. Komplementaarisen RNA-juosteen kanssa muodostuvan kaksoiskierteen nukleaasiresistenssiä tutkittiin hiiren maksan homogenaatissa (taulukko 4). [24]

Taulukko 4. Oligodeoksiribonukleotidien sulamislämmöt komplementaarisen RNA:n läsnäollessa ja ODN:n hajoaminen hiiren maksahomogenaattien läsnäollessa. [24]

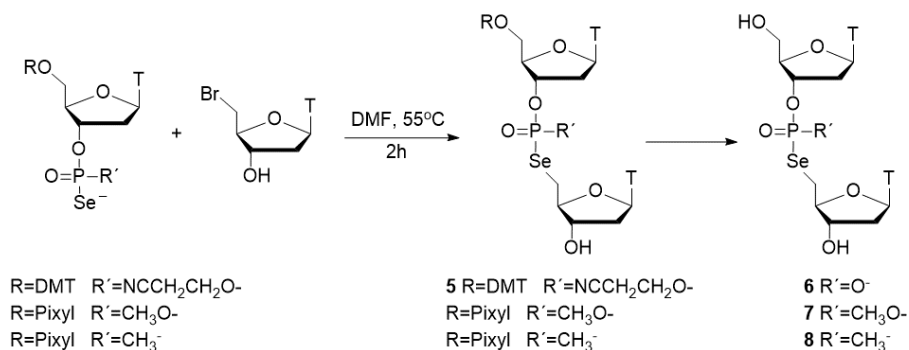
ODN (5' → 3') ^a	<i>T_m</i> RNA:n kanssa (°C)	Ehjä gapmeeri (%) ^b	Täysipituinen kohde-RNA (%) ^c
d(G ^{LMe} C ^L ATTGGTATT ^{LMe} C ^L A ^L)	59,4	–	5,8
d(G ^{LMe} C ^L A _{3'} SPTTGGTATT ^{LMe} C ^L A ^L)	60,0	68	17,3
d(G ^{LMe} C ^L A _{5'} SPTTGGTATT ^{LMe} C ^L A ^L)	58,5	56	9,9
d(G ^{LMe} C ^L AT _{3'} SPTGGTATT ^{LMe} C ^L A ^L)	62,5	34	13,6
d(G ^{LMe} C ^L AT _{5'} SPTGGTATT ^{LMe} C ^L A ^L)	57,4	56	11,4
d(G ^{LMe} C ^L ATTGG _{3'} SPTATT ^{LMe} C ^L A ^L)	62,5	1,2	10,0
d(G ^{LMe} C ^L ATTGG _{5'} SPTATT ^{LMe} C ^L A ^L)	58,5	41	11,3

^a L = LNA, ^b ehjän gapmeerin %-osuus kokeen jälkeen. ^c täysimittaisen kohde-RNA:n %-osuus 48 h inkubaation jälkeen.

Tutkimuksen tuloksista havaitaan, että 3'-SP-sidoksen vaikutus oli vaihtelevaa riippuen sen sijainnista. Yksittäiset 5'-SP-modifikaatiot pienensivät vain vähän kaksoiskierteen pysyvyyttä. Modifioidut gapmeerit kykenivät sitoutumaan tehokkaasti entsyymiin in vitro -kokeissa, mutta in vivo -kokeissa niiden aktiivisuus vaihteli.

3.3. Fosforoselenaatit

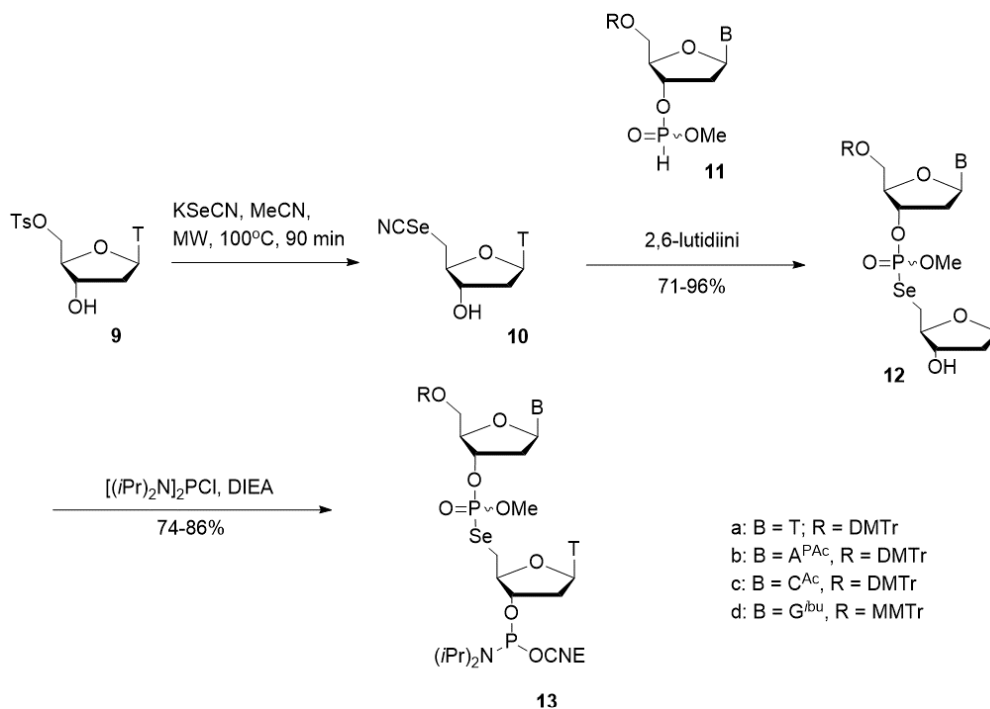
Fosforoselenaateissa fosfodiesterisidoksen happiatomi on korvattu seleenillä. Vuonna 1994 Stecin ryhmä [25] korvasi fosfodiesterisidoksen O5'-happiatomin seleenillä syntetisoidessaan dimeerisen ditymidiinifosforoselenaatin **6**, *O*-metyylifosforoselenaatin **7** ja metyylifosfonoselenaatin **8** (Kaavio 2). P-akiraalinen yhdiste **6** valmistettiin käsittelemällä yhdisteen **5** diastereomeerista seosta 80 % etikkahapolla, jota seurasi käsittely trietyyliamiinilla.



Kaavio 2. Ditymidiinifosforoselenaatin (**6**), *O*-metyylifosforoselenaatin (**7**) ja metyylifosfonoselenaatin (**8**) synteesi.

Ditymidiinifosforoselenaatilla **6** havaittiin merkittävää SVPDE- ja nukleaasi P1 resistenssin kasvua verrattuna PS-ditymidiinianalogiin verrattuna. Sitä vastoin yhdisteiden **7** ja **8** todettiin olevan liian labiileja nukleasiresistenssin tutkimiseksi. Fosforoselenaattioligonukleotideja, joissa silloittava O3'-happiatomi on korvattu seleenillä (3'-SeP-ODN) on käytetty templaatiohjetussa kemiallisessa ligaatiossa. [26]

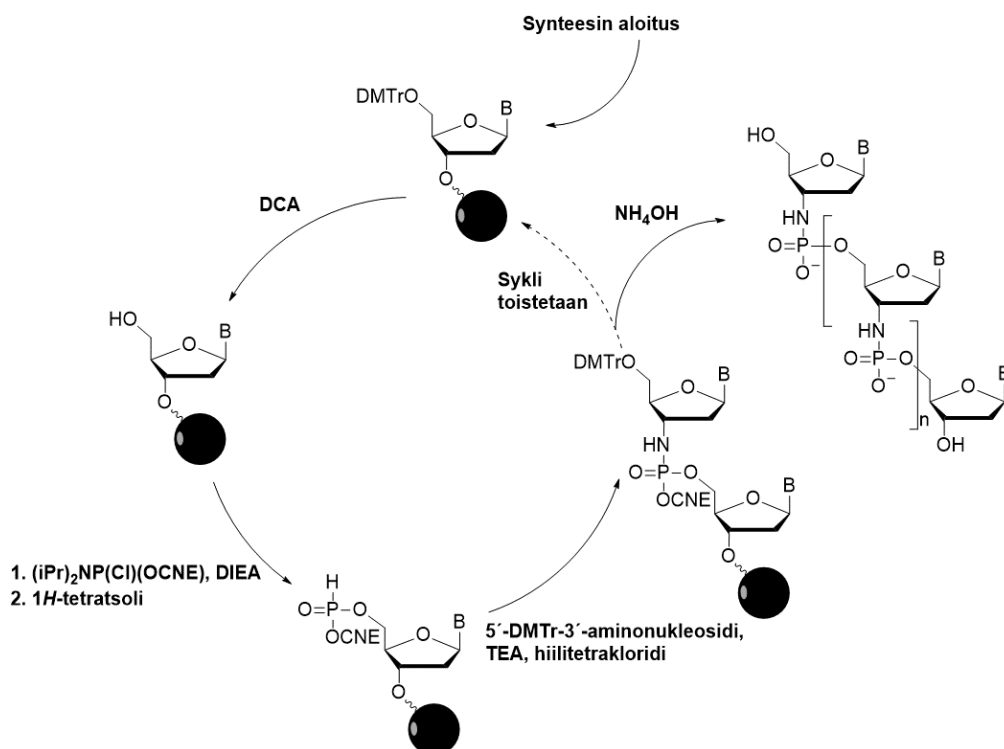
Vuonna 2019 Conlon työryhmineen [27] raportoivat fosforoselenaattioligonukleotidien synteessin kiinteällä kantajalla soveltaen Vylen kehittämää selenosyanaattien Michaelis-Arbuzov-reaktiota. [28] Ensin 5'-*O*-Tosyylytymidiinistä **9** muodostettiin 5'-selenosyanaatti **10** säteilyttämällä mikroaalloilla kaliumselenosyanaatin läsnäollessa asetonitriilissä. Nukleosidi-3'-*H*-fosfonaattijohdannaiset **11** kytkettiin 5'-selenosyanaattinukleosidin **10** kanssa asetonitriilissä 2,6-lutidiinin läsnäollessa. Lopuksi dimeerit **12a-d** fosfityloitiin fosforamidiittirakennusyksiköiksi **13a-d** (kaavio 3), jotka kytkettiin kasvavaan oligonukleotidiketjuun automatisoidusti oligosyntetisaattorilla standardiprotokollan mukaisesti. [27]



Kaavio 3. Fosforamidiittirakenneyksiköiden **13a-d** synteisi.

3.4. Fosforamidaatit

Fosforamidaateilla fosfodiesterisidoksen yksi happiatomeista on korvattu typpiatomilla. Gryaznov [29] työryhmineen raportoi N3′→P5′NP-ODN:n synteessin kiinteällä kantajalla (kaavio 4). Detritylaatio suoritettiin dikloorietikkahapolla dikloorimetaanissa. 5′-Hydroksyyliiryhmä fosfityloitiin (2-syanoetoksi)-(N,N-diisopropyylialkyyl)kloorifosfiinilla ja N,N-diisopropyylietyyliamiinin (DIEA) läsnäollessa fosforamidiitiksi, jonka jälkeen aminoligandi korvattiin vedellä käyttäen aktivaattorina tetratsolia. 5′-O-dimetoksitryloitu 3′-deoksi-3′-aminonukleosidi kytkettiin kasvavaan oligonukleotidiketjuun käyttäen hapettavaa aminaatiota hiilitetrakloridin ja trietyyliamiinin (TEA) läsnäollessa. Atherton-Todd-reaktio mahdollistaa aminonukleosidien kytkennän kasvavaan oligonukleotidiketjuun 94–96 % keskimääräisellä saannolla reaktiosykliä kohden. Syntetisoitu fosforamidaatti irrotetaan kantajasta ammonolyysillä. Tutkimustulosten perusteella havaittiin NP-ODN/ODN-kaksoiskierrteen olevan pysyvämpi kuin kahden modifioimattoman oligodeoksiribonukleotidin muodostama kaksoiskierre. Fosforamidaattioligodeoksiribonukleotidien todettiin myös muodostavan stabiileja kolmoiskierrteitä komplementaarisen oligoribonukleotidin kanssa. [29]



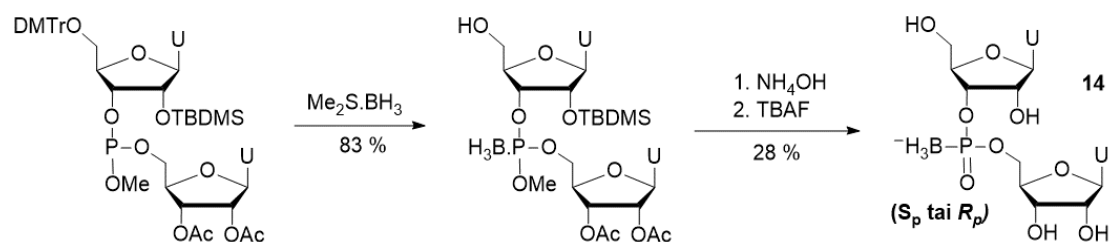
Kaavio 4. N3'→P5'NP-ODN synteesi.

Fosforamidaattien toimivuutta antisense-oligonukleotideina on tutkittu selvittämällä niiden kykyä sitoutua lähetti-RNA:han ja aktivoida RNAasi-H entsyymi. Tutkimuksessa kohteeksi valittiin lähetti-RNA:n alueet, jotka translaatiossa koodataan Tax-proteiiniksi, joka on ihmisen tyypin I leukemiaviruksen tärkein transkriptiotekijä. Tutkimukset suoritettiin 15-meerisillä fosforamidaateilla, ja tuloksia verrattiin saman sekvenssin omaavien happianalogien, fosforotioaattien sekä kimeeristen oligodeoksisribonukleotidien (NP-ODN/PO-ODN) kanssa. Nukleasiresistenssiä tutkittaessa selvisi, että NP-ODN pysyi stabiilina 1 h ajan, kun happianalogi hajosi täysin 5 minuutin aikana. Tutkimustulosten perusteella NP-ODN:llä on potentiaalia antisense-oligonukleotidina. Kaikilla muilla yhdisteillä paitsi PO-ODN:llä havaittiin Tax-proteiinin määrän väheneminen 70 %:lla. Fosforamidaateilla kaksoiskierteiden pysyvyys kasvoi 1,2 °C jokaista modifikaatiota kohden happianalogiin verrattuna. [30]

3.5. Boranofosfaatit

Uridylyyli-3',5'-uridiinin *R_P*- ja *S_P*-boranofosfaattidiastereomeerit syntetisoitiin hapettamalla fosfiittitriesteri dimetyylisulfidiboraanilla. 2'-OH:n suojarahmänä käytettiin tetrabutyylidimetyylisilyyliä, joka poistettiin TBAF-käsittelyllä synteesin viimeisessä vaiheessa (kaavio 5). Boranofosfaatin **14** *S_P*-diastereomeerin SVPDE-katalysoiman hydrolyysin puoliintumisaika on 80 h. *R_P*-diastereomeeri on täysin stabiili. Vastaavan

uridylyyli-3',5'-uridiinin tapauksessa puoliintumisaika oli vain 7 min. Dimetyylisulfidiboraanin todettiin irrottavan myös trityylisuojauksen. [31]



Kaavio 5. Uridylyyli-3',5'-uridiinin R_P - ja S_P -boranofosfaattidiastereomeerien synteysi.

Vastaavalla tavalla on syntetisoitu diastereomeerinen ditymidiniboranofosfaatti on syntetisoitu käsittelemällä 5'-*O*-dimetoksitriityyli-3'-*O*-asetyyli-suojattu ditymidinifosfiittitriesteri dimetyylisulfidiboraanilla. Asetyyli- ja metyyylisuojaukset poistettiin ammonolyysillä. Boranofosfodiesterisidoksen todettiin olevan hyvin pysyvä 1M:ssa vetykloridin metanoliliuoksessa ja konsentroidussa ammoniakkin vesiliuoksessa 55 °C:ssa sekä SVPDE- ja CSPDE-entsyymien läsnäollessa. [32]

Sergueeva työryhmineen on kehittänyt boranofosfaattien synteestrategiaa kiinteällä kantajalla *H*-fosfonaattimenetelmällä. 12-Meeristen oligotymidylaattien ekso- ja endonukleasiresistenssiä tutkittiin matalassa ja suuressa nukleasi-konsentraatiossa. Taulukossa 5 on esitetty havaitut puoliintumisajat hydrolyysille suuremmissa konsentraatioissa. Kuten nähdään kaikki nukleasit hydrolysoivat modifioimattoman oligotymidylaatin nopeasti. Boranofosfaattianalogin hydrolyysin todettiin olevan hitaampi kuin vastaavan fosforotioaatin SVPDE:n, P1 nukleasin ja S1-nukleasin läsnäollessa. [33]

Taulukko 5. 12-Meeristen oligotymidylaattien puoliintumisajat eri nukleasien läsnäollessa. [33]

Entsyymi	$t_{1/2}$		
	SVPDE	P1 nukleasi	S1 nukleasi
c (µg/ml)	20	10	5
d(T ₁₂)	<1 min	<1 min	<1 min
[d(T ₁₂)] -all-PS ^a	2 h	<5 min	<5 min
[d(T ₁₂)] -all-BP ^a	7 h	6 h	70 h

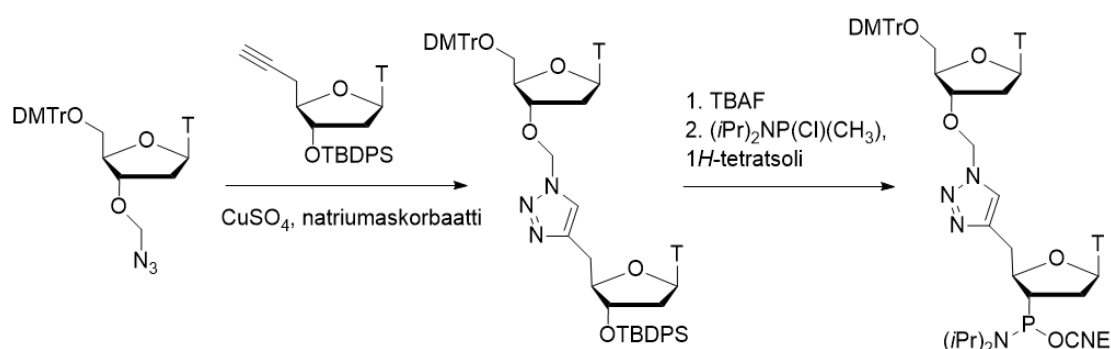
^a all-PS/BP = kaikki ovat tiofosfordiesterisidoksia/boranofosfaattisidoksia

4. Fosforia sisältämättömät nukleosidien väliset sidokset

Fosfodiesterisidokset voidaan korvata myös kokonaan fosforia-sisältämättömillä rakenteilla. Tällaisia modifikaatioita ovat dialkyylisulfidi-, boronaatti-, piperatsiini-, *S*-metyyliurea-, triatsoli-, amidi-, guanidiini-, metyleeni(metyyliamino)- ja karbamaatti-ryhmät, joista 6:ta viimeksi mainittua on käytetty syntetisoitaessa täysin modifioitu oligonukleotidi.

4.1. Triatsolit

Varizhuk työryhmineen [34] on raportoinut kimeerisen triatsolimodifioidun oligonukleotidin (TR/ODN) synteesin hyödyntäen ditymidiinifosforamidiitin triatsolijohdannaista rakennusyksikkönä sekä kiinteällä kantajalla suoritettavaa synteesimenetelmää (kaavio 6). Komplementaarisen DNA-juosteen kanssa muodostuvan kaksoiskierteen puoliintumisajat mitattiin DNAasi 1:n läsnäollessa (taulukko 6). [34] Tutkimuksen tuloksista havaittiin kaksoiskierteen pysyvyyden väheneminen, noin -1,5 °C jokaista modifikaatiota kohden. Puoliintumisaika kuitenkin kaksinkertaistui DNAasi 1:n läsnäollessa viitaten kasvaneeseen nukleasiresistenssiin. [34]



Kaavio 6. Ditymidiinifosforamidiitin triatsolijohdannaisen synteesi.

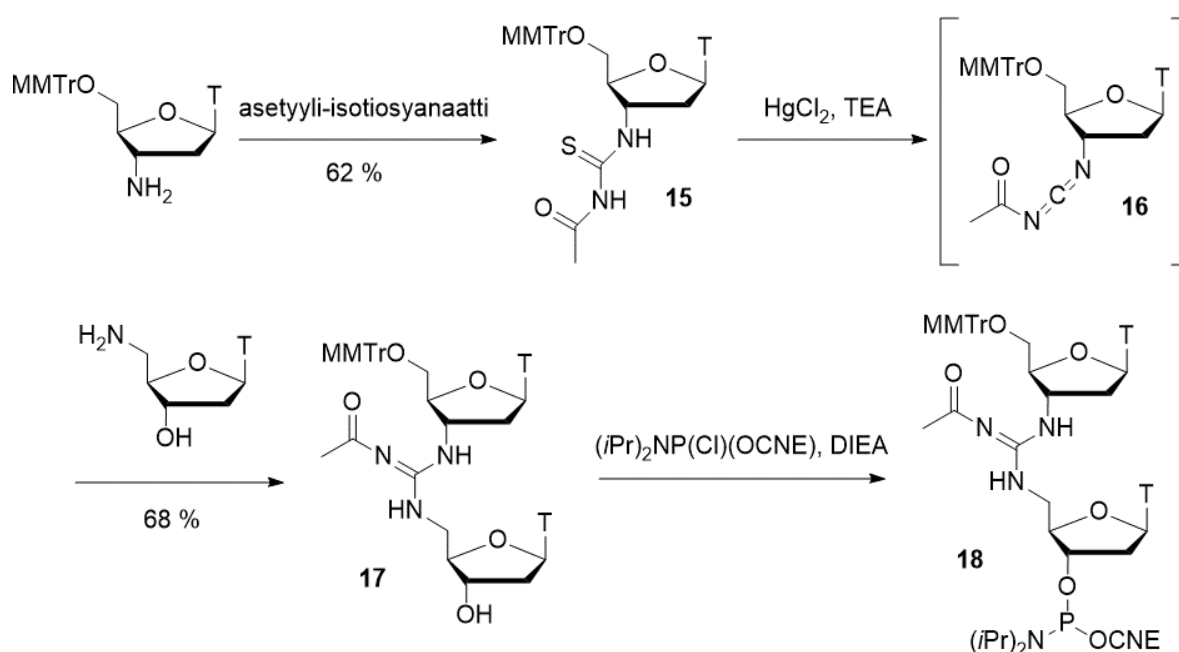
Taulukko 6. Oligodeoksiribonukleotidien sulamislämmöt komplementaarisen DNA:n kanssa ja kaksoiskierteiden puoliintumisajat DNAasi 1:n läsnäollessa. [34]

ODN (5' → 3') ^a	T_m DNA:n kanssa	$t_{1/2}$ (min)
d(TTAACTTCTTCACATTC)	50,3	15
d(T _{TR} TTAACTTCT _{TR} TTCACAT _{TR} TC)	40,4	30

^a TR = triatsoli

4.2. Guanidiinit

Nukleosidien välinen fosfodiesterisidos voidaan korvata myös *N*-substituoidulla guanidiiniryhmällä. Bruicen tutkimusryhmä [35] raportoi ditymidiinifosforamidiitin asetyyliguanidiini-johdannaisen synteessin, jota käytettiin rakennusyksikkönä valmistettaessa 18-meerinen oligonukleotidi. 5'-*O*-MMTr-3'-amino-3'-deoksitymidiini (**15**) asetyloitiin asetyyli-isotiosyanaatilla DCM:ssä, jota seurasi käsittely hopeadikloridilla TEA:n läsnäollessa. Väli tuotteena saatu karbodi-imidi **16** kytkettiin 5'-amino-5'-deoksitymidiinin kanssa asetyylisuojatuksi guanidiiniditymidiiniksi **17**. Asetyyliguanidiiniditymidiinifosforamidiitti (**18**) saatiin käsittelemällä yhdiste **17** (2-syanoetoksi)-(*N,N*-diisopropyyli)kloorifosfiinilla *N,N*-diisopropyylietyyliamiinin (DIEA) läsnäollessa (kaavio 7). [35]



Kaavio 7. Asetyyliguanidiiniditymidiinifosforamidiitti rakennusyksikön synteesi.

Guanidiinioligonukleotidien nukleaasiresistenssiä tutkittiin eksonukleaasi 1:n läsnäollessa. Tutkimuksen tuloksista havaittiin useita 3'-pään guanidiini modifikaatioita sisältävän ODN:n olevan täysin resistenssi eksonukleaasi 1:lle. Luonnollisen ODN:n puoliintumisaika oli vastaavissa olosuhteissa 30 minuuttia. [35]

5. Johtopäätökset

Terapeuttisten oligonukleotidien käyttö lääkeaineina yleistyy tulevaisuudessa. Luonnolliset oligonukleotidit hydrolysoituvat herkästi elimistössä entsyymikatalyyttisesti, joten erilaiset

rakenteelliset modifikaatiot oligonukleotideissa ovat välttämättömiä. On siis tarve muokata luonnollisten oligonukleotidien fosfaattirunkoa, jotta saadaan kasvatettua nukleasiresistenssiä. Fosfodiesterisidoksen muokkaamiseen on monia synteettisiä menetelmiä, joista tutkielmassa käsitellään fosforotioaatti-, fosforotiolaatti-, forforamidaatti-, boranofosfaatti- ja fosforoselenaatti-modifikaatiot. Useimmat näistä modifikaatioita parantavat oligonukleotidin nukleasiresistenssiä. Fosforotioaatit ovat edellä mainituista modifioiduista oligonukleotideista eniten tutkittu ja käytetty terapeuttisissa sovelluksissa. Monet muutkin modifikaatiot ovat kuitenkin osoittaneet potentiaalia toimia antisense-oligonukleotidina niillä suoritetuissa tutkimuksissa, mahdollisesti johtaen lisätutkimuksiin ja uusien lääkkeiden kehittymiseen.

6. Viitteet

- [1] W. B. Wan and P. P. Seth, "The Medicinal Chemistry of Therapeutic Oligonucleotides," *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9645–9667, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00551.
- [2] C. M. Perry and J. A. B. Balfour, "Fomivirsen," *Drugs.* **1999**, *57*, 375–380, doi: 10.2165/00003495-199957030-00010.
- [3] F. J. Raal *et al.*, "Articles Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial," *Lancet.* **2010**, *375*, 998–1006, doi: 10.1016/S0140.
- [4] G. Clavé, M. Reverte, J. J. Vasseur, and M. Smietana, "Modified internucleoside linkages for nuclease-resistant oligonucleotides," *RSC Chemical Biology.* **2021**, *2*, 94–150, doi: 10.1039/d0cb00136h.
- [5] N. V Amirkhanov, E. Zamaratski, and J. Chattopadhyaya, "The recognition and cleavage of RNA in the antisense oligo–RNA hybrid duplexes by RNase H," *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 489–491, doi: [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)01997-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01997-3).
- [6] B. L. Dhananjaya and C. J. M. D'Souza, "An Overview on Nucleases (DNase, RNase, and Phosphodiesterase) in Snake Venoms," *BIOCHEMISTRY-MOSCOW.* **2010**, *75*, 1–6, doi: 10.1134/S0006297910010013.
- [7] W. J. Stec, G. Zon, and W. Egan, "Automated solid-phase synthesis, separation, and stereochemistry of phosphorothioate analogs of oligodeoxyribonucleotides," *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6077–6079, doi: 10.1021/ja00332a054.
- [8] R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan, and S. L. Beaucage, "3H-1,2-Benzodithiole-3-one 1,1-dioxide as an improved sulfurizing reagent in the solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates," *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1253–1254, doi: 10.1021/ja00159a059.
- [9] B. P. Monia, J. F. Johnston, H. Sasmor, and L. L. Cummins, "Nuclease Resistance and Antisense Activity of Modified Oligonucleotides Targeted to Ha-ras*," *Journal of Biological Chemistry.* **1996**, *271*, 14533–14540, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.14533>.
- [10]; J Val, M. A. Zounes, W. F. Lima, and S. M. Freier, "Evaluation of 2' Modified Oligonucleotides Containing 2'-Deoxy Gaps as Antisense Inhibitors of Gene Expression*," *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 19954–19962, doi: 10.1016/S0021-9258(19)85268-7.
- [11] W. J. Stec *et al.*, "Diastereomers of Nucleoside 3'-O-(2-Thio-1,3,2-oxathia(selena)phospholanes): Building Blocks for Stereocontrolled Synthesis of Oligo(nucleoside phosphorothioate)s," *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12019–12029, doi: 10.1021/ja00154a001.

- [12] R. P. Iyer, D. Yu, N.-H. Ho, W. Tan, and S. Agrawal, "A novel nucleoside phosphoramidite synthon derived from 1R, 2S-ephedrine," *Tetrahedron Asymmetry*. **1995**, *6*, 1051–1054, doi: [https://doi.org/10.1016/0957-4166\(95\)00122-6](https://doi.org/10.1016/0957-4166(95)00122-6).
- [13] M. Guo, D. Yu, R. P. Iyer, and S. Agrawal, "Solid-phase stereoselective synthesis of 2'-O-methyl-oligoribonucleoside phosphorothioates using nucleoside bicyclic oxazaphospholidines," *Bioorg Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2539–2544, doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(98\)00450-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00450-8).
- [14] A. Wilk, A. Grajkowski, L. R. Phillips, and S. L. Beaucage, "Deoxyribonucleoside Cyclic N-Acylphosphoramidites as a New Class of Monomers for the Stereocontrolled Synthesis of Oligothymidyl- and Oligodeoxycytidyl- Phosphorothioates," *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2149–2156, doi: 10.1021/ja991773u.
- [15] N. Oka, M. Yamamoto, T. Sato, and T. Wada, "Solid-Phase Synthesis of Stereoregular Oligodeoxyribonucleoside Phosphorothioates Using Bicyclic Oxazaphospholidine Derivatives as Monomer Units," *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16031–16037, doi: 10.1021/ja805780u.
- [16] N. Oka, T. Kondo, S. Fujiwara, Y. Maizuru, and T. Wada, "Stereocontrolled Synthesis of Oligoribonucleoside Phosphorothioates by an Oxazaphospholidine Approach," *Org. Lett.* **2009**, *11*, 967–970, doi: 10.1021/ol802910k.
- [17] Y. Nukaga, K. Yamada, T. Ogata, N. Oka, and T. Wada, "Stereocontrolled Solid-Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligoribonucleotides Using 2'-O-(2-Cyanoethoxymethyl)-nucleoside 3'-O-Oxazaphospholidine Monomers," *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7913–7922, doi: 10.1021/jo301052v.
- [18] W. B. Wan *et al.*, "Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages," *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 13456–13468, doi: 10.1093/nar/gku1115.
- [19] K. W. Knouse *et al.*, "Unlocking P(V): Reagents for chiral phosphorothioate synthesis," *Science (1979)*. **2018**, *361*, 1234–1238, doi: 10.1126/science.aau3369.
- [20] S. M. Gryaznov and R. L. Letsinger, "Chemical ligation of oligonucleotides in the presence and absence of a template," *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3808–3809, doi: 10.1021/ja00062a070.
- [21] S. M. Gryaznov and R. L. Letsinger, "Synthesis and properties of oligonucleotides containing aminodeoxythymidine units," *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3403–3409, doi: 10.1093/nar/20.13.3403.
- [22] G. P. Miller and E. T. Kool, "A Simple Method for Electrophilic Functionalization of DNA," *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3599–3601, doi: 10.1021/ol0264915.
- [23] Y. Xu and E. T. Kool, "Chemical and enzymatic properties of bridging 5'-S-phosphorothioester linkages in DNA," *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3159–3164, doi: 10.1093/nar/26.13.3159.

- [24] J. Duschmalé *et al.*, “In vitro and in vivo properties of therapeutic oligonucleotides containing non-chiral 3' and 5' thiophosphate linkages,” *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 63–74, doi: 10.1093/nar/gkz1099.
- [25] L. A. Wozniak, M. Sochacki, H. Mitsuya, S. Kageyama, and W. J. Stec, “A new class of dinucleotide analogues. The synthesis of 3'-*O*-thymidylyl(5'-deoxy-5'-seleno-thymidylyl)-Selenophosphoselenolate, its *O*-methyl ester and methanephosphonate derivatives.,” *Bioorg Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1033–1036, doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80676-4](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80676-4).
- [26] Y. Xu and E. T. Kool, “Rapid and Selective Selenium-Mediated Autoligation of DNA Strands,” *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9040–9041, doi: 10.1021/ja994019h.
- [27] P. F. Conlon *et al.*, “Solid-phase synthesis and structural characterisation of phosphoroselenolate-modified DNA: a backbone analogue which does not impose conformational bias and facilitates SAD X-ray crystallography,” *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10948–10957, doi: 10.1039/C9SC04098F.
- [28] O. Eguaojie, P. F. Conlon, and J. S. Vyle, “Synthesis of nucleoside phosphoroselenolates via the efficient Michaelis–Arbuzov reaction of selenocyanates,” *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 5000–5002, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.09.096>.
- [29] S. Gryaznov and J.-K. Chen, “Oligodeoxyribonucleotide N3'.fwdarw.P5' Phosphoramidates: synthesis and Hybridization Properties,” *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3143–3144, doi: 10.1021/ja00086a062.
- [30] S. M. Gryaznov *et al.*, “Oligonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **1995**, *92*, 5798–5802, doi: 10.1073/pnas.92.13.5798.
- [31] Y.-Q. Chen, F.-C. Qu, and Y.-B. Zhang, “Diuridine 3',5'-boranophosphate: Preparation and properties,” *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 745–748, doi: [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(94\)02439-I](https://doi.org/10.1016/0040-4039(94)02439-I).
- [32] A. Sood, B. R. Shaw, and B. F. Spielvogel, “Boron-containing nucleic acids. 2. Synthesis of oligodeoxynucleoside boranophosphates,” *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9000–9001, doi: 10.1021/ja00180a066.
- [33] D. S. Sergueev and B. R. Shaw, “H-Phosphonate Approach for Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleoside Boranophosphates and Their Characterization,” *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9417–9427, doi: 10.1021/ja9814927.
- [34] A. M. Varizhuk *et al.*, “Synthesis of Triazole-Linked Oligonucleotides with High Affinity to DNA Complements and an Analysis of Their Compatibility with Biosystems,” *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5964–5969, doi: 10.1021/jo400651k.
- [35] D. A. Barawkar and T. C. Bruice, “Synthesis, biophysical properties, and nuclease resistance properties of mixed backbone oligodeoxynucleotides containing cationic internucleoside guanidinium linkages: Deoxynucleic guanidine/DNA chimeras,” *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **1998**, *95*, 11047–11052, doi: 10.1073/pnas.95.19.11047.