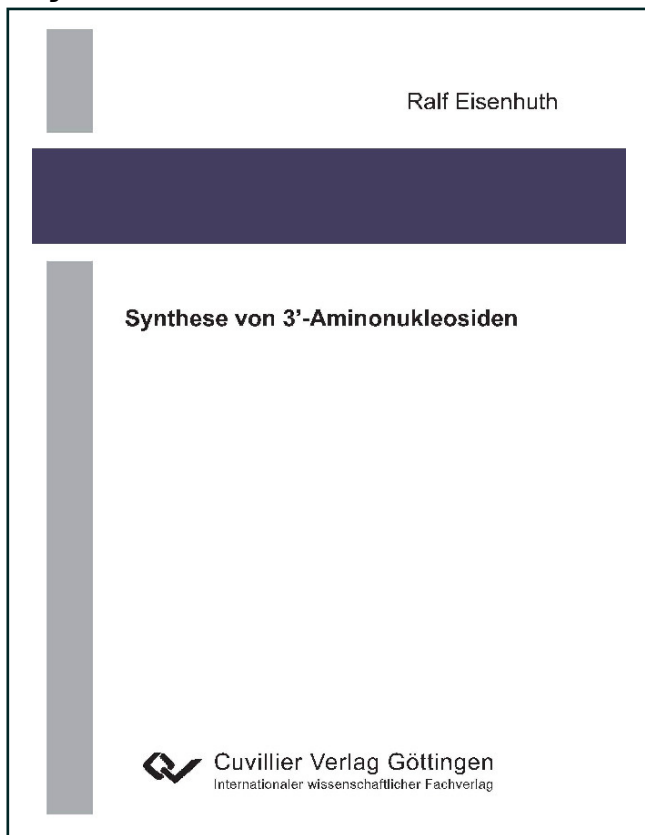




Ralf Eisenhuth (Autor)

Synthese von 3'-Aminonukleosiden



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1203>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1. Einleitung

Aminonucleoside wie 5'-Amino-5'-desoxythymidin (**1**) und 3'-Amino-3'-desoxythymidin (**2**) sind isoelektronische Analoga des natürlich vorkommenden Nucleosids Thymidin (Abbildung 1). Aminonucleoside werden seit Jahrzehnten für bioorganische Studien verwendet. Sowohl 5'-Amino-2'-desoxythymidin als auch 3'-Amino-3'-desoxythymidin wurden erstmals 1962 von Horwitz und Mitarbeitern beschrieben.^{1,2} Letsinger und Mitarbeiter konnten Anfang der 1970er Jahre zeigen, dass DNA-Analoga mit Phosphorsäureamidgruppierungen im Rückgrat, die aus Aminonucleosiden synthetisiert werden, von Polymerasen erkannt werden.^{3,4} Dies belegt wie strukturell ähnlich solche DNA-Analoga zu ihren natürlichen Vorbildern sind. Eine Literatursuche im *Web of Science*⁵ nach Phosphorsäureamiden (phosphoramidate, engl.) ergibt über 700 Einträge, viele davon sind über Oligonucleotidanaloga. Dies zeigt, wie aktiv diese Verbindungen erforscht werden.

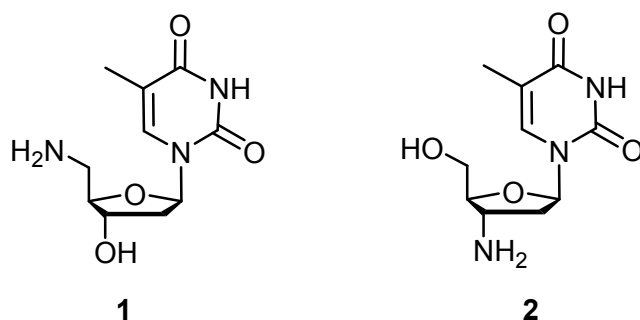


Abbildung 1: Die zu Thymidin isoelektronischen Aminonucleoside 5'-Amino-5'-desoxythymidin und 3'-Amino-3'-desoxythymidin.

Oligonucleotide mit Phosphorsäureamid-Rückgrat zeigen interessante Eigenschaften als Antisense-Inhibitoren der Genexpression. Gryaznov und Kollegen konnten in den letzten 15 Jahren eine ganze Reihe von Verbindungen mit *N3'-P5'*-Phosphorsäureamid-Rückgrat vorstellen, die in der biologischen Testung erfolgreich waren. Insbesondere Verbindungen mit 2'-Arabino-2'-fluor-*N3'-P5'*-Einheiten⁶ werden von der Firma *Geron* (Menlo Park, USA) weiter zu Pharmaka entwickelt. Das besondere Interesse an Oligonucleotiden mit *N3'-P5'*-Phosphorsäureamid-Rückgrat beruht auf der Beobachtung, dass diese stabilere Duplexe mit DNA- und RNA-Gegensträngen ausbilden als die entsprechenden *N5'-P3'*-Derivate.⁷ Einige pharmakologisch interessante Phosphorsäureamid-Rückgratstrukturen sind in Abbildung 2 dargestellt.

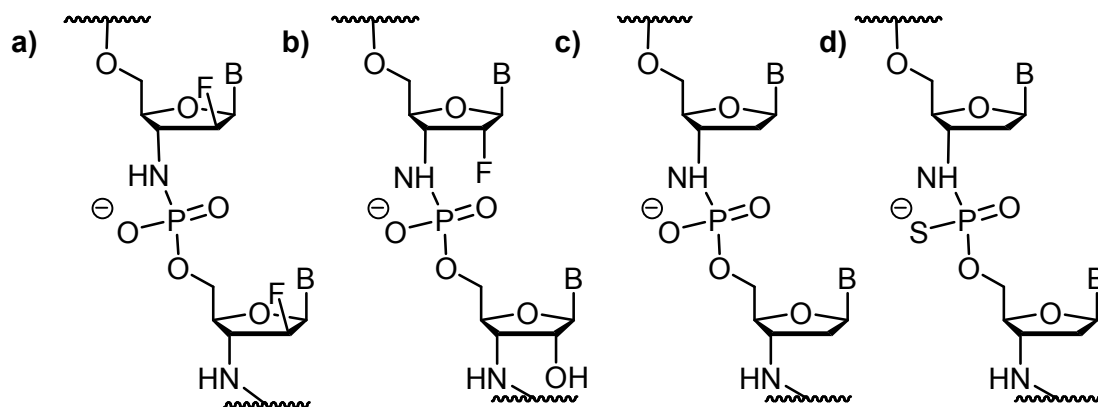


Abbildung 2: Ausschnitte aus den Strukturen von Oligonukleotid-Strängen, die von der Firma *Geron* für pharmakologische Anwendungen entwickelt wurden: a) 2'-Arabino-2'-fluor-*N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamid b) 2'-Ribo-2'-fluor-*N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamid c) *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamid (Stammverbindung) d) *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamidthioat.

Die Entwicklung der 2'-Arabino-2'-fluor-*N3'*-*P5'*-Oligonucleotide⁸ (Abbildung 2a) wurde durch die Beobachtung motiviert, dass es bei Synthesen der 2'-Ribofluor-*N3'*-*P5'*-Derivaten (Abbildung 2b) während der ammoniakalischen Abspaltung des Stranges von der festen Phase zur Bildung von Anhydroderivaten der Pyrimidine kam.^{9,10} Dieser Ringschluß geschieht nach S_N2 unter Abspaltung eines Fluoridions durch einen intramolekularen Angriff des Sauerstoffatoms an der 2-Position der Kernbase. Die Positionierung des Fluorsubstituenten in der Arabinoposition verhindert diese Nebenreaktion. Weiterhin zu sehen sind die *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamide^{11,12,13,14} (Abbildung 2c) und die von diesen abgeleiteten *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamidthioate¹⁵ (Abbildung 2d). Die Synthesen der ersten Generation auf *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamidbindungen basierender Antisense-Oligonucleotide (den *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamide, Abbildung 2c), beinhalteten anfangs eine oxidative Kupplung von 5'-DMT-geschützten 3'-Aminonucleosiden (Abbildung 3a) an H-Phosphonate.¹⁶ Spätere Synthesen und solche der nachfolgenden Generationen wurden mit 5'-Phosphitamidin durchgeführt. In Abbildung 3b sind hierzu beispielhaft die von Hirschbein und Mitarbeitern beschriebenen 5'-Phosphitamide¹⁷ zur Synthese der *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamide dargestellt.

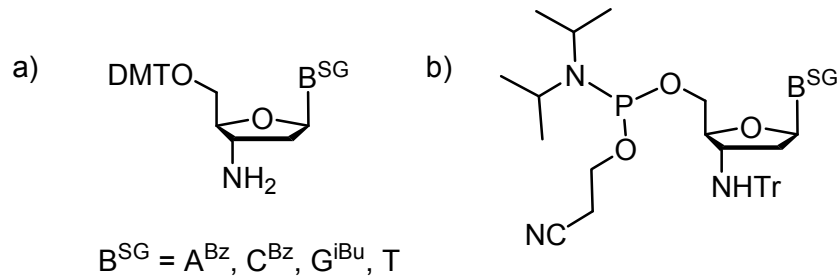


Abbildung 3: Nucleoside, die zur Synthese von N3'-P5'-Phosphorsäureamid-Antisense-Oligonucleotiden eingesetzt wurden. a) 5'-DMT-geschützte 3'-Aminonucleoside für den Kettenaufbau mittels oxidativer Kupplung, b) 3'-Aminotrylphosphoramidat zur Kettenverlängerung mittels Phosphoramidatmethode; SG = Schutzgruppe.

Phosphorsäureamide sind gegenüber enzymatischer Hydrolyse durch Exonucleasen stabiler als ihre Phosphordiester-Analoga. Dies ist für die Anwendung *in vivo* vorteilhaft. Dies gilt auch für andere Oligonucleotidanaloga, die als Antisense-Inhibitoren eingesetzt werden und ein verändertes Rückgrat enthalten.¹⁸ Es sind dies etwa die Phosphorthioate, die "Locked Nucleic Acids" (LNA)¹⁹ sowie "Peptide Nucleic Acids" (PNA)²⁰ (Abbildung 4).

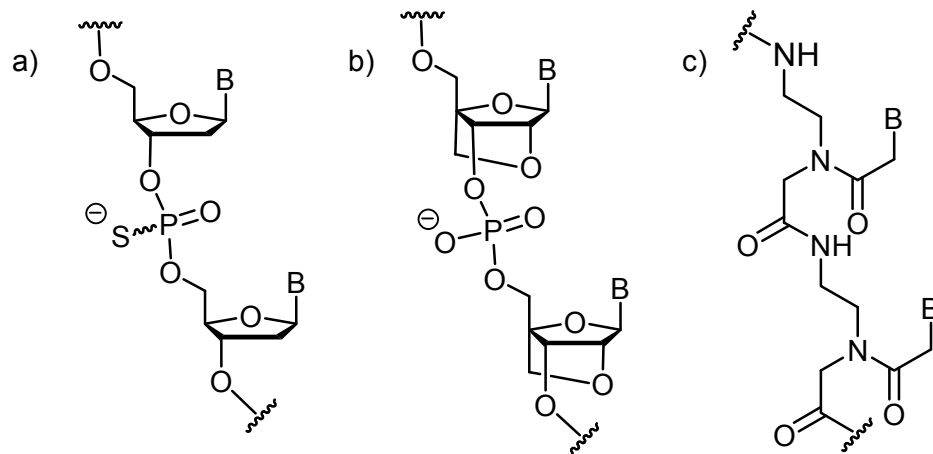


Abbildung 4: Rückgratmodifizierte Oligonucleotide die als Antisense Medikamente diskutiert werden. a) Ausschnitt aus einem Phosphorothioat-verbrückten DNA-Strang, b) Ausschnitt aus einem LNA-Strang c) Ausschnitt aus einem PNA-Strang. B = A, C, G, T.

DNA-Analoga mit Phosphorsäureamidgruppen im Rückgrat sind *chemisch* jedoch labiler als unmodifizierte DNA Stränge. Sie können unter mäßig sauren Bedingungen (z.B. 80%ige Essigsäure)^{21,22} unter Strangbruch zu freien Aminen und Phosphat-terminierten Fragmenten hydrolysiert werden. Dies hat Phosphorsäureamide für Anwendungen in der Diagnostik, zum Beispiel für die Genotypisierung²³ oder zur Sequenzierung²⁴ interessant gemacht. Mit dieser Motivation wurden Festphasensynthesen für Phosphorsäureamide bereits Ende der 1980er Jahre beschrieben (Abbildung 5).^{25,26}

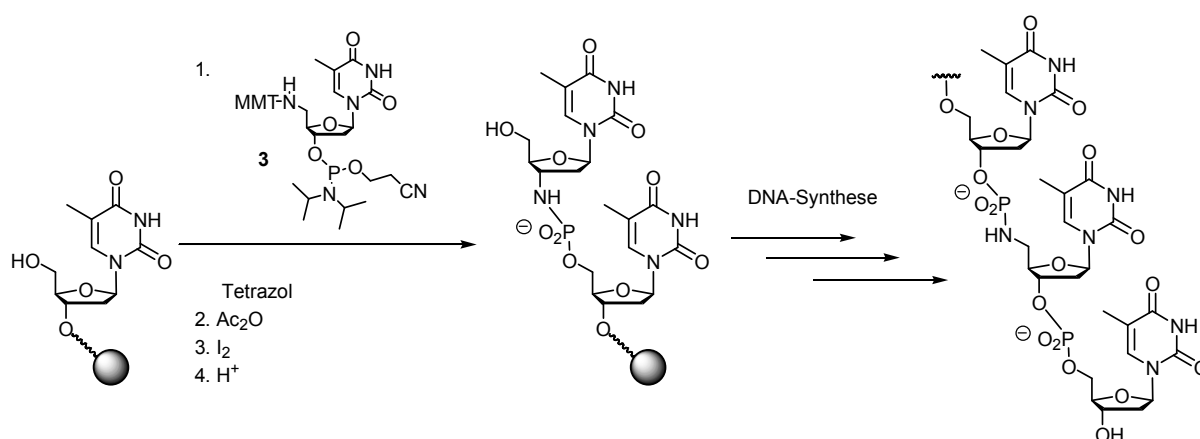


Abbildung 5: Synthese eines Oligonucleotids mit einer N5'-P3'-Phosphorsäureamidbindung unter Verwendung eines 5'-MMT-geschützten 5'-Aminophosphitamides nach Bannwarth.^{25,26}

Bei diesen Festphasensynthesen wird das Amin der Phosphorsäureamid-Einheit durch 5'-MMT-geschützte Aminophosphitamide eingeführt. Die zu der Synthese solcher Phosphitamide benötigten 5'-Aminonucleoside sind synthetisch anspruchsvolle Zielmoleküle. Dies wird daran deutlich, dass die Synthese des letzten kanonischen Bausteins, dem freien 5'-Amino-2',5'-dideoxyguanosin, erst 42 Jahre nach der Publikation der Synthese des 5'-Amino-5'-deoxythymidins durch Horwitz und Mitarbeiter¹ publiziert wurde.²⁴ Eine effiziente Synthese eines 3'-Phosphitamides des 5'-Amino-2',5'-dideoxyguanosin wurde von der hiesigen Gruppe im Jahre 2004 publiziert.²⁷ Diese Synthese ist in Abbildung 6 dargestellt.

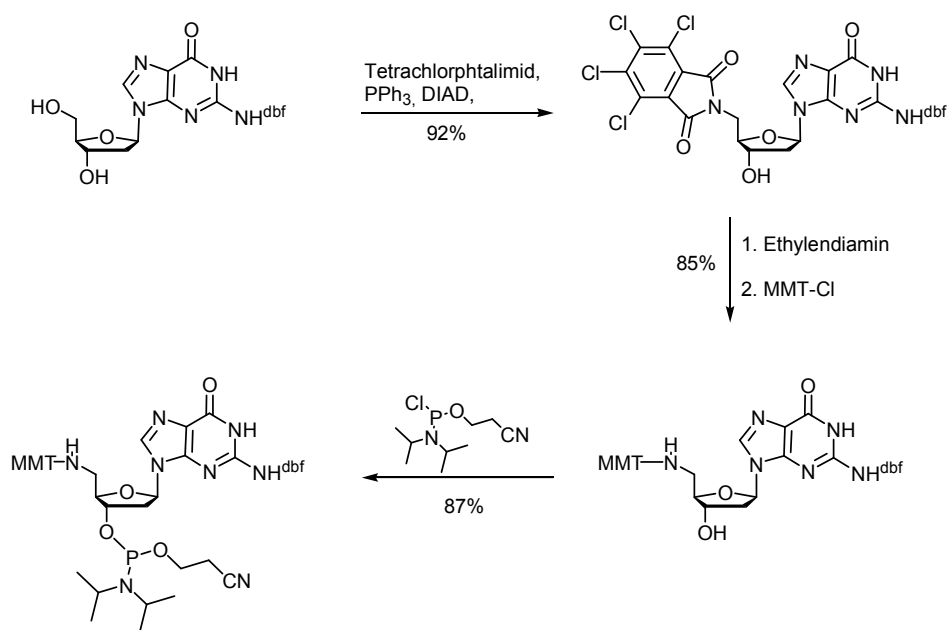


Abbildung 6: Synthese des 3'-Phosphitamides von 5'-MMT-geschütztem 5'-Amino-2',5'-dideoxyguanosin.²⁷

Umsetzungen mit Aminonucleosiden, beziehungsweise Nucleotiden, sind auch im Zusammenhang mit chemischen Replikationsvorgängen untersucht worden. Orgel und Mitarbeiter konnten seit 1976 mehrfach zeigen, dass Aminonucleotide wie die 2'-Amino-2'-desoxyribonucleotide schneller auf einem Templatstrang oligomerisieren als Ribonucleotidderivate, denen diese aliphatische Aminogruppe fehlt.^{28,29,30,31} Eines der ersten Reaktionssystemen von Orgel und Mitarbeitern ist in Abbildung 7 dargestellt.

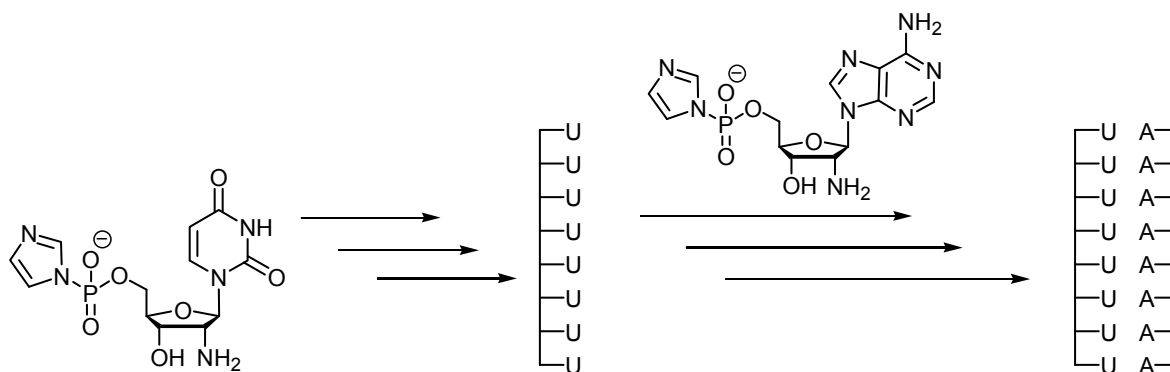


Abbildung 7: Stark vereinfachte Darstellung eines Reaktionssystems zur enzymfreien Replikation von Orgel und Mitarbeitern.²⁸ In dessen erstem Schritt wird ein als Imidazolid aktiviertes 2'-Amino-2'-desoxyuridinphosphat in Lösung polymerisiert. Die entstandenen Oligomere fungierten im nächsten Schritt als Template für die Polymerisation eines ebenfalls als Imidazolid aktivierten 2'-Amino-2'-desoxyadenosinphosphats.

In diesem Experiment wurde in einem ersten Schritt, das als Imidazolid aktivierte, 2'-Amin-2'-desoxyuridinphosphat in Lösung polymerisiert. Die hieraus erhaltenen Stränge fungierten im nächsten Schritt als Template für die templatgesteuerte Polymerisation des aktivierten 2'-Amino-2'-desoxy-adenosinphosphats.

Auch in der hiesigen Arbeitsgruppe wird intensiv an templatgesteuerten, enzymfreien Primerverlängerungsreaktionen gearbeitet. Hierbei steht aber nicht die möglichst vollständige Replikation von Homosequenzen im Vordergrund, sondern das effiziente Auslesen von genetischer Information bei DNA in einem beliebigen Sequenzzusammenhang.

In ersten Experimenten wurden enzymfreie Verlängerungsreaktionen an 3'-Aminoprimeren mit Methylimidazoliden von 2'-Desoxynucleosid-5'-monophosphaten an der 5'-terminalen Position eines DNA-Templats untersucht.³² Es konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart verschiedener 5'-Substituenten am Template, die als "molekulare Kappen" fungieren, die Selektivität und Effizienz der Primerverlängerung erhöht werden kann (Abbildung 8).

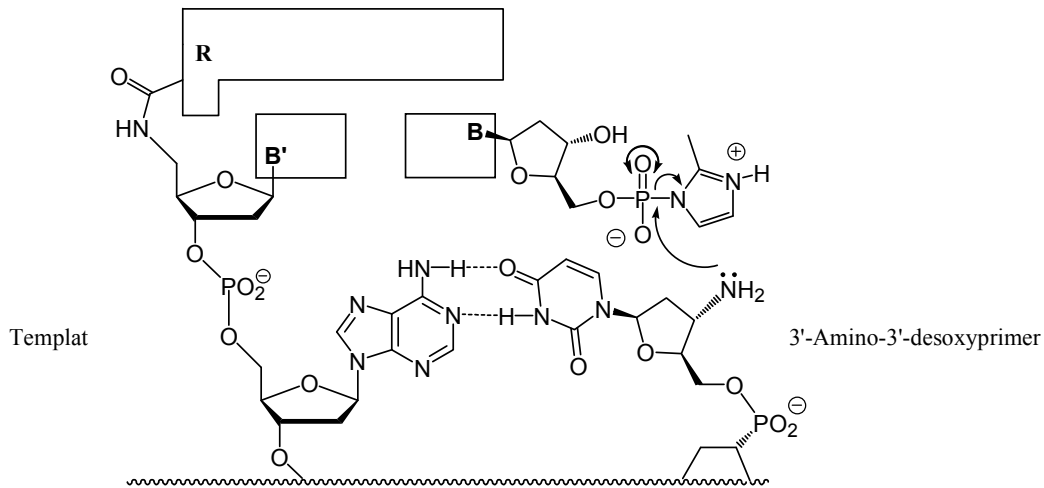


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer templatgesteuerten chemischen Verlängerung eines 3'-Amino-3'-desoxy-terminierten Primers in Gegenwart eines an der 5'-terminalen Position mit einer Kappe versehenen DNA Templats.³² (R = "molekulare Kappe", B, B' = A, C, G oder T)

Solche "molekulare Kappen" imitieren, in einer sehr schlichten Form, das aktive Zentrum einer Polymerase. Mit den in einer umfangreichen Studie getesteten Acylsubstituenten konnte eine bis zu 20-fache Beschleunigung der Reaktion, im Vergleich zu der Kontrolle, erreicht werden.³³ Die bei diesen Reaktionen erreichten Halbwertszeiten lagen zwischen 1 und 19 Stunden.

Ein sich unmittelbar "downstream" auf dem Templat befindliches Oligonukleotid, das auch als "Helper-Oligonukleotid" bezeichnet wird (Abbildung 9a), kann einen ähnlichen Effekt wie die oben beschriebenen 5'-Acylsubstituenten haben. Der Helper-Strang bildet mit dem Templat und dem 3'-Aminoprimer eine einfache Bindungstasche für das einzubauende aktivierte Monomer. Dies kann zu einer 44-fachen Beschleunigung der Reaktion im Vergleich zu der Kontrollreaktion ohne "Helper" führen.³⁴