



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Mehrfach 2'-PEGylierte Oligonukleotide für
effizientes Gensilencing“

verfasst von

Barbara Pöhacker

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Ernst Urban

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. Ernst Urban für die Möglichkeit bedanken, meine Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Chemie zu absolvieren.

Ein großer Dank gilt auch Dr. Johannes Winkler für die interessante Themenstellung und die umfangreiche Betreuung.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Mehrdad Dirin für die vielen Tipps und die freundliche, zeitaufwendige Unterstützung beim Arbeiten im Labor und beim Auswerten der Spektren.

Ein herzliches Dankeschön gilt meiner Familie, insbesondere meinen lieben Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich stets unterstützt haben.

Ich bedanke mich auch recht herzlich bei meinen Freunden und Studienkollegen, die stets für den nötigen Ausgleich gesorgt und mir das Studium zu einer so schönen Zeit gemacht haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem lieben Freund bedanken, der mir stets mit aufmunternden Worten zur Seite gestanden hat.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	3
Inhaltsverzeichnis	4
Zusammenfassung	6
Abstract	7
1. Einleitung	8
1.1. Nukleinsäure Therapeutika	8
1.2. Antisense Oligonukleotide und RNA-Interferenz	9
1.3. Probleme	11
1.4. Modifikationen von Oligonukleotiden.....	13
1.5. PEG Konjugate.....	16
2. Ziel.....	18
3. Materialien und Methoden.....	19
3.1. Synthese von 2' –Aminohexyl-adenosin mit entsprechenden Schutzgruppen für Oligonukleotidsynthese ¹⁵ :.....	20
3.2. Synthese, Entschützung und Aufreinigung der siRNA.....	24
3.2.1. Synthese am Festphasensynthesizer	24
3.2.2. Abspaltung, Entschützung und Ausfällung.....	26
3.3. Synthese, Entschützung und Aufreinigung der SSO	27
3.3.1. Synthese am Festphasensynthesizer	27
3.3.2. Abspaltung, Entschützung und Ausfällung.....	28
3.4. Entsalzen der Oligonukleotide und deren Konjugate	29
3.5. Kopplung mit NHS-aktivierten PEG-Ketten.....	29
3.6. Analytik der Oligonukleotide und der Konjugate.....	30
3.6.1. Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	30
3.6.2. High performance liquid chromatography (HPLC)	31
3.6.3. Elektronensprayionisation-Massenspektrometrie (ESI- MS)	31
4. Resultate	32
4.1. Oligonukleotidsynthese	32

4.1.1. Splice switching Oligonukleotide (SSO).....	32
4.1.2. siRNA.....	32
4.2. Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	33
4.3. High performance liquid chromatography (HPLC).....	37
4.3.1. SSO.....	37
4.3.2. siRNA.....	39
4.4. Elektronensprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS).....	40
5. Diskussion	41
5.1. Synthese von 2'- Aminoethyl-adenosin mit entsprechenden Schutzgruppen...	41
5.2. Synthese, Entschützung und Aufreinigung der Oligonukleotide	47
5.3. PEG- Konjugate	51
5.4. Konklusion:.....	52
6. Abkürzungen	53
7. Referenzen.....	55

Zusammenfassung

Kurze RNA und DNA Oligonukleotide können über Watson-Crick-Basenpaarungen mit einer Ziel-RNA interagieren und somit selektiv die Genexpression beeinflussen. Diese Eigenschaft macht unterschiedliche Oligonukleotide, wie Antisense Oligonukleotide, siRNAs und SSO, vor allem für die Therapie von genetischen und viralen Erkrankungen, sowie Krebs interessant.

Es befinden sich bereits einige Vertreter am Markt und in klinischer Testung, der große Durchbruch blieb aber noch aus. Dies liegt an der beschränkten Anwendungsmöglichkeit der Oligonukleotid Therapeutika. Große Hindernisse stellen der Abbau durch Enzyme, die kurze Halbwertszeit, die hohe renale Clearance, unspezifische Bindungen und der unzureichende Transport zur und in die Zelle dar. Um die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften der Oligonukleotide zu verbessern, werden unterschiedliche chemische Modifikationen, Konjugate und Transportvehikel entwickelt.

Im Laufe dieser Diplomarbeit wurde eine Konjugation von Oligonukleotiden mit Polyethylenglykol-Ketten durchgeführt. Eine solche PEGylierung führt gewöhnlich zu einer höheren Stabilität und Bioverfügbarkeit, während die Toxizität und immunologische Effekte abnehmen.

Ein Schwerpunkt war es, einen modifizierten Adenosin-Baustein zu synthetisieren, der anschließend mittels Festphasensynthese in ein Oligonukleotid eingebaut werden konnte. Dazu wurde zunächst ein Phosphoramidit-Nukleotid mit entsprechenden Schutzgruppen an den 3'- und 5'-Positionen hergestellt, das zur späteren PEGylierung einen Aminohexyl-Linker in 2'-Position des Zuckers besaß.

Die Reaktions- und Aufreinigungsschritte wurden mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert und die Strukturaufklärung der Produkte erfolgte mittels ^1H -NMR und ^{13}C -NMR Spektroskopie.

Ein weiterer Schwerpunkt der Diplomarbeit lag bei der Herstellung der PEG-Konjugate. Die Oligonukleotide mit den modifizierten Nukleosiden wurden mittels optimierter Methode abgespalten, entschützt und aufgereinigt und anschließend erfolgreich mit NHS-aktivierten PEG-Ketten gekoppelt. Die Reaktionsverläufe und Aufreinigungsschritte wurden mittels HPLC und Gelelektrophorese kontrolliert. Zuletzt wurden die aufgereinigten Oligonukleotide und ihre Konjugate mittels ESI-MS analysiert.

Abstract

Short RNA or DNA oligonucleotides are able to interact with RNA-targets with high selectivity by engaging in Watson-Crick base pairing. As a result, they are able to manipulate gene expression. Because of their properties, oligonucleotides like antisense oligonucleotides, siRNA's and splice switching oligonucleotides, have tremendous potential in the treatment of various diseases like genetic disorders, viral infections and cancer.

Although there are some oligonucleotides approved and more in clinical testing, the great breakthrough hasn't been achieved yet. This is because of the limited opportunities for application of oligonucleotides. There are some important hurdles like degradation through enzymes, short half-life, high renal clearance, off-target effects and insufficient delivery of the oligonucleotides. To improve pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, chemical modifications and conjugates or vesicles for delivery have been developed.

Conjugates of oligonucleotides with PEG-chains were produced during this diploma thesis. PEGylation is a viable way to improve stability and bioavailability whereas toxicity and immunologic processes are decreased.

The main aim was the synthesis of a modified adenosine, which would later be introduced in an oligonucleotide during solid phase synthesis.

Therefore it was necessary to synthesize a phosphoramidite-molecule with appropriate protection groups at the 3'- and 5'-position. For the planned PEGylation there was a linkage in 2'-position of the nucleotide sugar. Reactions and purification steps were controlled with DC and products were analyzed with ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectroscopy. The preparation of PEG-conjugates was another point of main effort.

First, methods for cleavage, deprotection and purification of the oligonucleotides had to be optimized. Then the oligonucleotides were conjugated with NHS-activated PEG-chains. Reactions and purification steps were controlled with HPLC and gel electrophoresis. In the end the oligonucleotides and their conjugates were analyzed with ESI-MS.

1. Einleitung

1.1. Nukleinsäure Therapeutika

Kurze DNA und RNA Oligonukleotide tragen seit ihrer Entdeckung zur Entwicklung hochpotenter Therapeutika bei¹.

Da sie befähigt sind mit komplementären Sequenzen Watson-Crick-Basenpaarungen einzugehen, können sie selektiv mit einer Ziel-RNA interagieren^{5, 19}. Somit ist es ihnen möglich die Genexpression gezielt zu beeinflussen. Diese Eigenschaft lässt vermuten, dass Oligonukleotide für die Behandlung vieler Krankheiten, vor allem aber genetische Erkrankungen, Viruserkrankungen und Krebs bahnbrechend sein können^{16, 25}.

Seit den ersten Errungenschaften gab es im Gebiet der Nukleinsäure Therapeutika auch wesentliche Fortschritte. Dennoch konnten die eingesetzten Oligonukleotide den vielversprechenden Erwartungen noch nicht vollständig gerecht werden¹.

Schon in den späten 1970ern wurde durch Paterson et al. bekannt, dass es möglich ist die Genexpression durch exogene Nukleinsäuren zu verändern. 1978 zeigten Stephenson und Zamecnik im Zellversuch, dass ein kurzes einzelsträngiges DNA-Molekül (13-mer) in der Lage ist die Replikation eines Rous-Sarkom-Viruses zu verhindern². Somit schafften sie den Begriff der Antisense Technologie. Diese Errungenschaft erweckte das Interesse zur Entwicklung weiterer Technologien, die den Einsatz von synthetischen Oligonukleotiden als Therapeutika in lebenden Zellen möglich machten.

Wichtige Fortschritte brachten dabei die Entdeckung von Ribozymen durch Cech und Altman und die Darstellung von siRNA durch Fire und Mello in den 1990ern³. In letzter Zeit werden sich durch den Einsatz von shRNA's und miRNA's Fortschritte in der Therapie von Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen erhofft.

1.2. Antisense Oligonukleotide und RNA-Interferenz

Alle Oligonukleotid Mechanismen haben eines gemeinsam: Das Binden des Oligonukleotids an die Ziel-RNA. Was danach passiert, hängt von der Chemie, dem Design des Oligonukleotids und der Stelle, an der das Oligonukleotid bindet, ab⁴.

Antisense Oligonukleotide sind einzelsträngige, DNA-basierte Nukleinsäuren, die ihre Wirkung über verschiedene Mechanismen erreichen können³⁰. Nachdem die Antisense Oligonukleotide ihren Wirkort erreicht haben, hybridisieren sie an ihren komplementären RNA-Strang. Nach der Hybridisierung können sie ihre Wirkung entweder über sterischen Block des Translationsapparates oder über die Aktivierung von RNase H ausüben (Abb.1.01)³. RNase H ist eine Familie von Enzymen, die in Säugetierzellen für die Spaltung von RNA in RNA/DNA Heteroduplexen zuständig ist⁴. Antisense Oligonukleotide bilden also einen RNA/DNA Duplex mit ihrer komplementären mRNA aus, induzieren RNase H und führen somit zu einer Spaltung des RNA-Stranges. Dieser Mechanismus hat sich als robuster Antisense Mechanismus erwiesen und wird sowohl zu Forschungszwecken als auch zu therapeutischen Zwecken genutzt³.

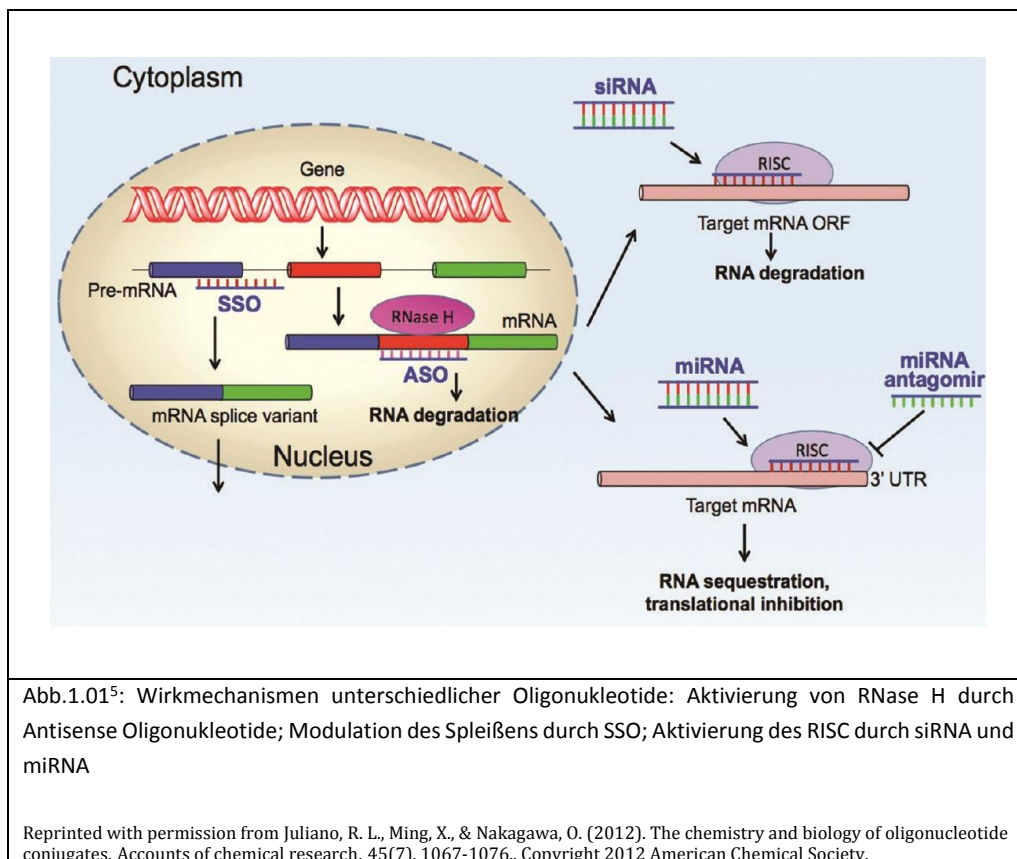
Anlehnend an die "klassischen" Antisense Oligonukleotide wurden sogenannte splice switching Oligonukleotide entwickelt. Durch die Verwendung von Oligonukleotiden, die eine Komplementarität gegenüber Splice-Junctions aufweisen, ist es möglich den nuklearen Spleißapparat so zu manipulieren, dass einzelne Exons oder Segmente von Introns eingefügt oder entfernt werden können (Abb.1.01)^{5,29}. Da die Aktivierung von RNase H hier nicht erwünscht ist, werden chemisch modifizierte Oligonukleotide (z.B. 2'-O-methyl; 2'-O-methoxyethyl; PNAs; LNAs; Morpholino Oligonukleotide) eingesetzt, die dazu nicht im Stande sind^{20, 31}.

Nahezu 50% der genetischen Mutationen, die zu Erkrankungen führen, betreffen den Spleißvorgang der prä-mRNA²⁴. Die Technologie der splice switching Oligonukleotide soll zur erfolgreichen Behandlung dieser Krankheiten führen. Hierzu zählen unter anderem die Duchenne Muskeldystrophie und die β -Thalassämie²¹.

Ein weiterer Mechanismus zur Verhinderung der Genexpression ist die RNA-Interferenz (RNAi), auch post-transkriptionales Gensilencing genannt. Dieser Mechanismus besitzt das wohl größte therapeutische Potential und erweckt deswegen auch großes Interesse¹.

RNA-Interferenz ist ein natürlicher Prozess in eukaryotischen Zellen bei dem doppelsträngige RNA mRNA Sequenz-spezifisch spaltet⁴.

Kurze, synthetisch hergestellte, doppelsträngige RNA-Segmente (ca. 21 Nukleotide; short interfering RNA; siRNA) können, nachdem sie im Zytoplasma angekommen sind, in einen Multiprotein-Komplex (RNA-induced silencing complex; RISC) eingelagert werden³⁰. Dort wird die doppelsträngige RNA (dsRNA) zunächst entwunden und der Sense-Strang durch ein Argonautenprotein (Ago 2) gespalten, während der Antisense Strang erhalten bleibt³. Der aktivierte RISC bindet im Zytosol mRNA, die dem Antisense Strang komplementär ist. Die mRNA im RNA/RNA Duplex wird von Ago 2 gespalten und durch enzymatische Prozesse weiter abgebaut (Abb.1.01).



1.3. Probleme

Trotz der vielversprechenden Einsatzmöglichkeiten von Oligonukleotiden als Therapeutika, ist der klinische Erfolg bisher nicht zufriedenstellend. Jahrelange Forschung und Entwicklung brachten nur mäßigen Erfolg¹.

Dies beruht unter anderem auf den äußerst schlechten Eigenschaften unmodifizierter Oligonukleotide bezogen auf die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik^{5, 17}.

Um eine systemische Wirkung zu erreichen, müssen Oligonukleotide bis zum Zytoplasma bzw. Zellkern ihrer Zielzelle vordringen. Der Weg dorthin aber birgt viele Hindernisse.

So wird das Phosphodiester-Rückgrat unmodifizierter Oligonukleotide schon kurz nach Applikation von endogenen Nukleasen angegriffen und abgebaut, was eine Wirkung nach systemischer Verabreichung undenkbar macht⁷.

Außerdem führen eine geringe Plasmaproteinbindung und eine schnelle Ausscheidung über die Niere zu einer geringen Halbwertszeit²⁶.

Eine weitere Barriere stellt die Zellmembran dar. Da Oligonukleotide große, polare Moleküle sind, können sie biologische Membranen nicht permeieren²⁷.

Zusätzlich stellt die gewünschte spezifische Bindung an ein einzelnes Zielgen ein Problem dar¹. Theoretisch sollten Oligonukleotide nur die Expression eines Zielgens modulieren. In der Praxis aber gestaltet sich dies schwierig, was zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen kann. Partielle Komplementarität des Zielgens mit anderen Genen, nicht spezifische Bindung z.B. von Phosphorthioaten und Interaktionen mit Komponenten des angeborenen Immunsystems oder anderen Proteinen erschweren die spezifische Modulation eines Zielgens⁵.

Die geringe Stabilität, die kurze Halbwertszeit und der verminderte Transport zur und in die Zelle führen zu einer geringen Bioverfügbarkeit und somit zu einer unzufriedenstellenden Wirkung von Oligonukleotiden.

Während das Problem der Instabilität durch chemische Modifikationen am Oligonukleotid relativ gut gelöst werden kann, ist der ineffiziente Transport bis heute problematisch. Um dieses Problem zu umgehen, wurden zunächst Oligonukleotide zur lokalen Applikation an Organen wie Auge, Lunge, Haut, Schleimhaut und lokalen Tumoren entwickelt¹. Danach machte die Entwicklung viraler und synthetischer Vehikel auch eine systemische Applikation möglich. Durch Konjugation natürlicher oder modifizierter Oligonukleotide

mit zellspezifischen Liganden oder Aptameren kann der zell- bzw. gewebsspezifische Transport zumindest in präklinischen Experimenten verbessert werden¹⁶.

Modifizierte Oligonukleotide können also durch die Erhöhung der Bioverfügbarkeit zur Entwicklung vielversprechender Arzneistoffe beitragen.

1.4. Modifikationen von Oligonukleotiden

Aufgrund ihrer Eigenschaften können Antisense Oligonukleotide und siRNA per se nicht als therapeutische Mittel eingesetzt werden. Durch chemische Modifikationen und Konjugationen aber ist es möglich Oligonukleotide herzustellen, die eine verbesserte Stabilität, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik aufweisen^{1,5}.

Bei siRNAs ist aber zu beachten, dass die Möglichkeiten für chemische Modifikationen stark limitiert sind, da der RISC keine starken Modifikationen zulässt⁸.

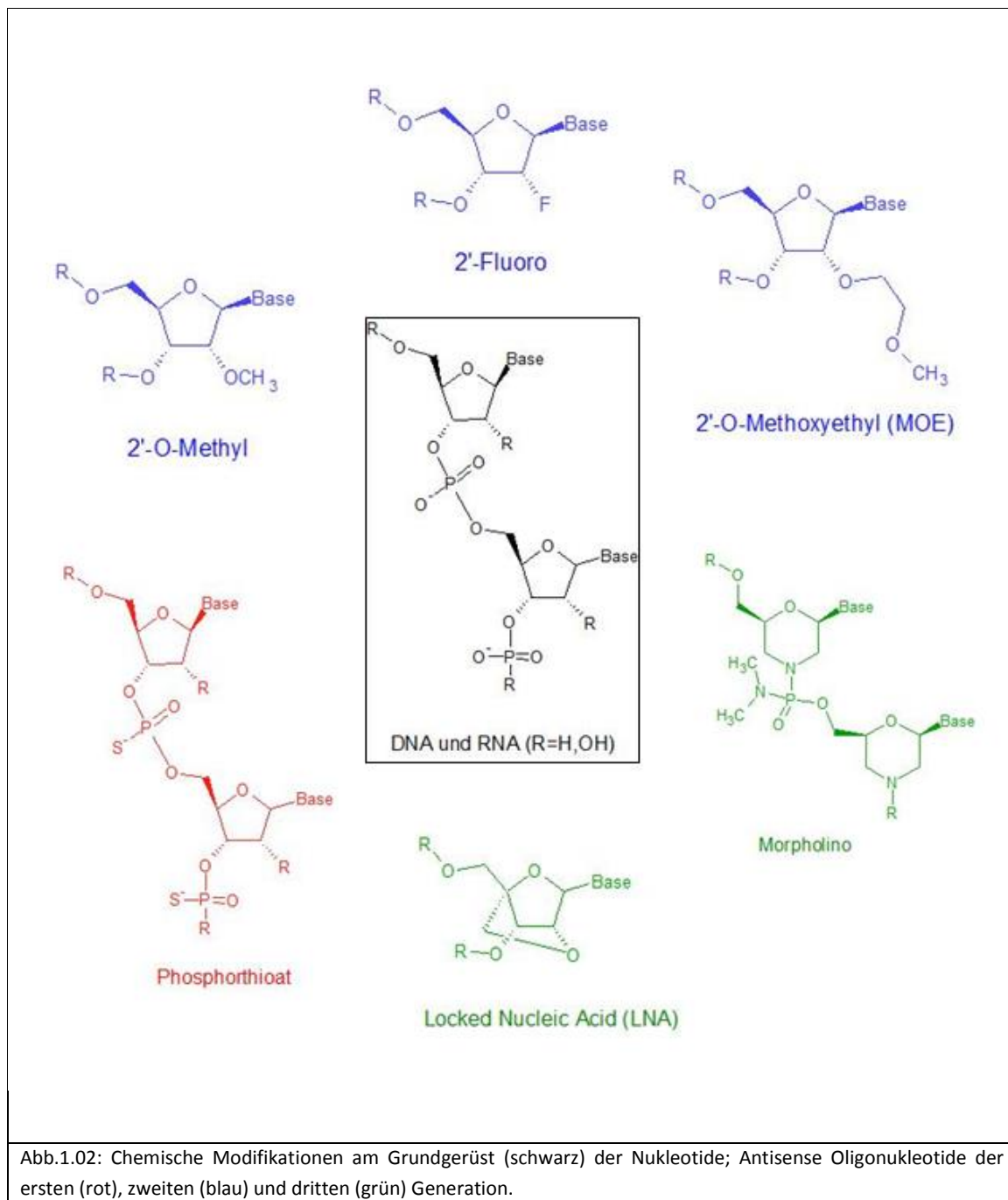
Modifikationen am Grundgerüst

Generell können Veränderungen am Grundgerüst sowohl bei DNA als auch bei RNA Nukleotiden durchgeführt werden. Sie können das Phosphatrückgrat, den Zucker und auch die Base betreffen⁷.

Eine weit verbreitete Modifikation am Phosphatrückgrat ist der Austausch von einem Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom, wodurch sogenannte Phosphorthioate entstehen. Solche Oligonukleotide werden als Antisense Oligonukleotide der ersten Generation bezeichnet (Abb.1.02)¹⁵. Phosphorthioate haben eine erhöhte Stabilität gegenüber Nukleasen, führen zu einer verlängerten Halbwertszeit und können Zellmembranen besser permeieren^{4,5}. Sie haben aber den Nachteil, dass sie sperrig sind und auch unspezifisch an Proteine binden können, was zu Zytotoxizität führen kann³.

Andere wichtige Modifikationen betreffen die 2'-O-Position des Nukleotid-Zuckers. Durch die Substitution mit aliphatischen Resten entstehen 2'-O-alkyl-Derivate, sogenannte Antisense Oligonukleotide der zweiten Generation (Abb.1.02)^{5,31}. Kurze Alkylreste beeinflussen die Duplexbindung nur schwach, während sie die Stabilität stark erhöhen⁷. 2'-O-Alkyl-Derivate sind aber nicht in der Lage RNase H zu induzieren, wodurch ihre Effektivität abnimmt¹⁸. Um diesen Effektivitätsverlust zu umgehen wurden sogenannte Gapmere entwickelt. Gapmere bestehen zentral aus einigen Nukleotiden, die RNase H induzieren können (z.B. Phosphorthioate), die von 2'-O-modifizierten Nukleotiden eingeschlossen werden, welche wiederum für eine ausreichende Stabilität sorgen¹.

Zu den Antisense Oligonukleotiden der dritten Generation zählen diverse stärker verfremdete Strukturen, u.a. locked nucleic acids (LNAs), peptide nucleic acids (PNAs), hexitol nucleic acids (HNAs) und Morpholino Oligonukleotide (Abb.1.02)⁵.



Chemische Konjugation

Generell ist die Konjugation den strukturellen Modifikationen am Grundgerüst vorzuziehen, da so nicht nur bereits vorhandene Oligonukleotide verbessert werden können, sondern auch Oligonukleotide mit neuen Eigenschaften entstehen können¹.

Die Konjugation erfolgt meist am 3'- oder 5'- Ende des Oligonukleotids, da diese am leichtesten zugänglich sind. Aber auch in 2'- Position des Zuckers, an den Nukleotidbasen und am Phosphodiesterückgrat sind Konjugationen möglich⁵.

Die Addition von lipophilen Resten an Antisense Oligonukleotide und speziell siRNA hat sich als leistungsfähige Vorgehensweise bewiesen um die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften von Oligonukleotiden zu modifizieren⁵.

So führt die Konjugation mit Cholesterol zu einer vermehrten Interaktion der Oligonukleotide mit Albumin und Lipoproteinen¹. Außerdem wird, v.a. über hepatische Rezeptoren für Lipoproteine, die Aufnahme ins Gewebe erhöht.

Um den schlechten zell- und gewebspezifischen Transport zu verbessern, werden Oligonukleotide mit Kohlenhydraten oder Peptiden gekoppelt⁵.

Abgesehen davon können Konjugate mit Polymeren (PEG, PEI) zu einer verlängerten Halbwertszeit, höheren Stabilität, besseren Wasserlöslichkeit und geringeren Immunogenität und Antigenität führen²².

In den letzten Jahren wurden auch eine Anzahl von Nanocarrier, wie Mizellen und Liposomen, für den Transport von Oligonukleotiden getestet⁹.

1.5. PEG Konjugate

Schon 1977 berichteten Davies und Abuchowsky als erste von der PEGylierung - der kovalenten Konjugation von Molekülen mit einer oder mehreren Polyethylenglykol-Ketten mit unterschiedlichem Molekulargewicht¹⁰.

Seit ihrer Entdeckung spielen PEGylierungen vor allem im Bereich der Biopharmaka eine wichtige Rolle. Bei Peptiden und Proteinen können PEGylierungen durchgeführt werden, ohne dass die Sekundärstruktur verändert wird. So können pharmakokinetische Parameter und somit die Wirkung verbessert werden²². Ursprünglich wurden nichtselektive PEGylierungen an Aminogruppen durchgeführt, was zu heterogenen Gemischen von verschiedenen Isomeren führte. Mittlerweile gibt es aber verschiedenste chemische und enzymatische Methoden um auch selektive PEGylierungen durchzuführen. Eine seitenselektive PEGylierung führt zur Herstellung einzelner Isomere, was zu homogenen Produkten und somit zu einer besseren Bioaktivität führt³⁵. Arzneistoffe dieser Art zeigen gute Wirkung und befinden sich bereits am Markt (z.B. Peginterferon α und Pegfilgrastim).

Neben Biopharmaka können auch unterschiedlichste Trägersysteme wie z.B. Nanopartikel und Liposomen mit PEG-Ketten versehen werden. Eine solche PEGylierung führt vor allem zu einer Erhöhung der Stabilität und zu einer Verlängerung der Halbwertszeit. Ein Beispiel liefern Doxorubicin-haltige Liposomen, die mit Polyethylenglykol beschichtet sind.

Die PEGylierung spielt vor allem beim Arzneistofftransport eine wichtige Rolle. So führt eine PEGylierung von Oligonukleotiden zu einer erhöhten Stabilität, Absorption, Bioverfügbarkeit und Verteilung von biologischen Makromolekülen, während die Toxizität und immunologische Effekte verringert werden¹¹. Durch die Erhöhung des Molekulargewichts wird auch die renale Clearance verringert²⁸.

Das Ausmaß der Veränderungen hängt dabei stark von der PEG-Kettenlänge ab. So stabilisiert HMW PEG Moleküle besser als LMW PEG (MW < 1000)¹¹. Auch die Ausscheidungsrate von PEG und seinen Konjugaten über die Niere wird erst ab einem Molekulargewicht von über 40 kDa signifikant erniedrigt³². Hingegen nimmt die Fähigkeit der Duplexbildung mit zunehmender Kettenlänge ab, da die Kette eine sterische Hinderung darstellt⁷. Um dennoch eine ausreichende Duplexbindung gewährleisten zu können, wurden spezifisch abbaubare Linker (z.B. Disulfid-Linker; photolabile Linker)

entwickelt, die eine de-PEGylierung von therapeutischen Oligonukleotiden möglich machen^{11, 34}.

Das Einfügen von PEG-Ketten geschieht am häufigsten am 3'- oder 5'-Ende von Oligonukleotiden und kann entweder direkt während der Oligonukleotidsynthese (solid phase conjugation) oder nach der Abspaltung und Aufreinigung des Oligonukleotids (solution phase conjugation) durchgeführt werden¹³.

Bei der Konjugation auf der Festphase können z.B. über modifizierte Harze kurze PEG-Ketten direkt am 3'-Ende des Oligonukleotids eingefügt werden. Am 5'-Ende können PEGylierungen über modifizierte Phosphoramiditbausteine erfolgen^{9, 13}.

Die meisten Konjugationen aber, basieren auf der Kopplung von aktivierten PEG-Ketten mit Oligonukleotiden in flüssiger Phase. Hier reagieren funktionalisierte PEG Moleküle mit modifizierten Oligonukleotiden³³. Andere mögliche Konjugationsreaktionen beinhalten Click-Chemie, Disulfid-Bindungen und Michael Addition⁹.

Auch in 2'-Position des Zuckers können Konjugationen mit Alkylresten u.a. auch Methoxyethylresten (2'-MOE) zu einer verbesserten Stabilität führen. Durch die Modifikation an 2'-Position erlangen DNA-Oligonukleotide RNA-Ähnlichkeit und können so mit höherer Affinität an den komplementären RNA Strang binden⁵. Die Duplexbindung nimmt aber auch hier mit steigender 2'-Kettenlänge wegen negativer sterischer Effekte ab⁷.

Beispiele für PEG-Konjugate:

Der Wirkstoff Pegaptanib, ein RNA-Aptamer (28-mer), das mit zwei 20 kDA PEG-Ketten konjugiert ist, wird bereits zur intravenösen Behandlung der Altersbedingten Makuladegeneration (AMD) eingesetzt. Die PEGylierung wurde für eine längere Verweildauer im Auge eingesetzt.

Ein weiterer vielversprechender Wirkstoff ist Pegnivacogin, das als direkter Inhibitor von Faktor IXa als Antikoagulans in einer Phase-III-Studie bei akutem Koronarsyndrom getestet wird. Hierbei handelt es sich um ein modifiziertes RNA-Aptamer, bei dem die Zuckerreste mit einer 2'-Fluoro- einer 2'-OH- bzw. einer 2'-O-Methylgruppe versehen sind. Zusätzlich ist am 5'-Ende eine PEG-Kette (40 kDA) über einen C6-Amino-Linker angehängt¹⁴.

2. Ziel

Gegenstand dieser Diplomarbeit war die Herstellung stabiler Konjugate von Oligonukleotiden mit PEG-Ketten mittels 2'-Aminohexyl-Linker, und die Optimierung der Reaktionsschritte.

Dazu sollte zunächst ein Phosphoramidit-Baustein eines 2'-Aminohexyl-adenosins mit entsprechenden Schutzgruppen für die Synthese am Festphasensynthesizer synthetisiert werden, der in die Oligonukleotide eingebaut werden sollte.

Nach der Abspaltung und Entschützung der Oligonukleotide, sollten NHS-aktivierte PEG-Ketten über eine Amid-Bindung an diese gebunden werden.

Zur Überprüfung der einzelnen Reaktionsschritte, wurden geeignete Methoden zur Analytik mittels DC, HPLC und Gelelektrophorese entwickelt und angewendet.

Die Charakterisierung der Produkte sollte mittels ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR-Spektroskopie und ESI-MS erfolgen.

3. Materialien und Methoden

Synthese des modifizierten Adenosin-Bausteins:

Die Reagenzien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Sigma-Aldrich und Serva bezogen. Als stationäre Phase für die präparative Säulenchromatografie wurde Kieselgel 60 Å Porendurchmesser 0,035-0,070 mm der Firma Acros verwendet. Die Kieselgel-Alufolien für die Dünnschichtchromatographie stammten von der Firma Merck (Kieselgel 60 F 254 nm; Alufolien 20x20 cm). Die Entwicklung der DC-Platten erfolgte in herkömmlichen DC-Entwicklungskammern unter Kammersättigung. Die Detektion erfolgte mittels UV 254 nm bzw. durch Besprühung mit Seebach Reagens (2,5% Phosphormolybdänsäure, 1,0 % Cer(IV)sulfat-Tetrahydrat, 6,0% konz. Schwefelsäure und 90,5% Wasser).

Die ^1H - und ^{13}C -NMR Spektroskopien wurden mittels Varian 500 MHz bzw. mittels Bruker 200 MHz durchgeführt.

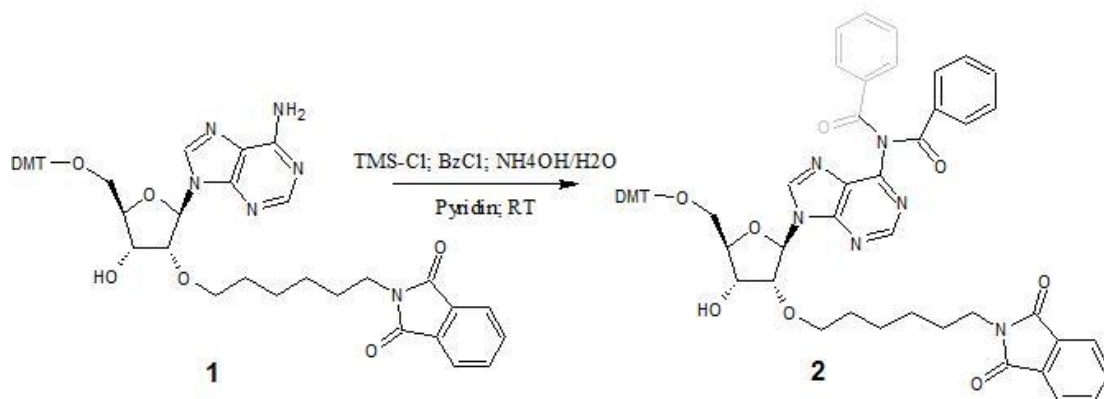
Oligonukleotidsynthese und Aufarbeitung der Oligonukleotide und ihrer Konjugate:

Die Reagenzien und Lösungsmittel wurden fast ausschließlich von den Firmen Sigma-Aldrich, Serva und Thermo Fisher Scientific bezogen. Wurden andere Produkte verwendet, ist dies angemerkt.

Für die Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide und ihrer Konjugate wurde das Nano-Drop Spektrophotometer ND-1000 von Peqlab Biotechnologie GmbH verwendet. Grundlage der Konzentrationsbestimmung war das Lambert-Beertsche Gesetz mit dem Extinktionskoeffizienten, der aus der Sequenz errechnet wurde.

3.1. Synthese von 2'-Aminoethyl-adenosin mit entsprechenden Schutzgruppen für Oligonukleotidsynthese¹⁵:

Reaktion 1: Einführung einer Benzoylschutzgruppe

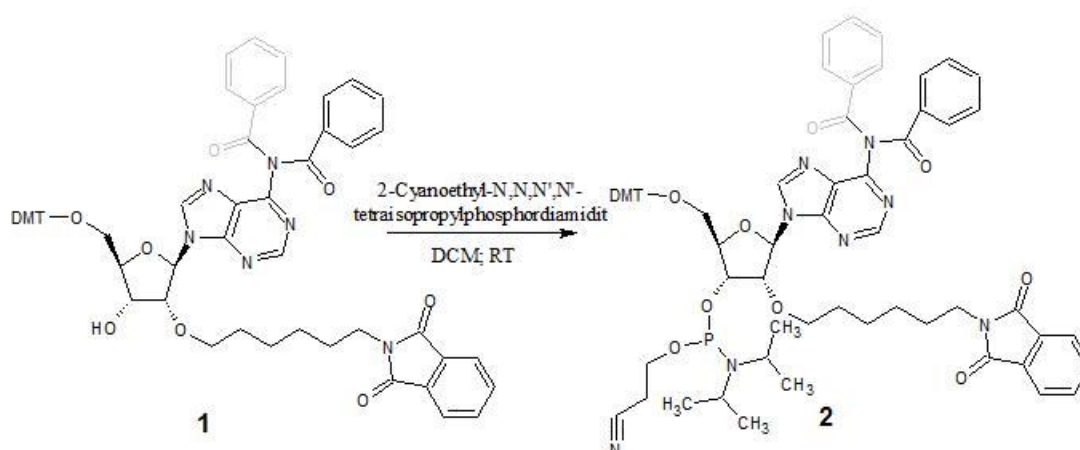


Das 2'-O-Aminoethyl-adenosinderivat **1** (1,5 g; 1,878 mmol) wurde unter Argon bei Raumtemperatur in 30 ml Pyridin gelöst. Nach 10 minütiger Kühlung im Eisbad wurde Trimethylsilylchlorid (3,75 ml; 29,44 mmol) langsam hinzuge tropft und 3 Stunden bei RT gerührt. Danach wurde Benzoylchlorid (2,0 ml; 13,01 mmol) hinzugefügt und 20 h bei RT gerührt. Um die Reaktion zu stoppen, wurde Eiswasser hinzugegeben und 30 min bei RT gerührt. Danach wurde erneut gekühlt und eine wässrige Ammoniumhydroxyd-Lösung (28-30%; 3,25 ml) hinzugegeben und 60 min bei RT gerührt.

Die Reaktionsmischung wurde in 50 ml MTBE aufgenommen und die organische Phase mit Wasser (3x50ml), NaHCO₃ ges. (3x50ml) und NaCl ges. (3x50ml) gewaschen. Danach wurde über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und am Rotavapor eingedampft. Zurück blieb ein weißer Schaum (Rohprodukt von **2**; 1,332 g).

Dieser wurde in etwas MTBE gelöst und mittels Säulenchromatographie (LM 1; siehe S.22) aufgereinigt. Die gesammelten Fraktionen wurden vereint und eingedampft. Der Rückstand wurde in 75 ml MTBE aufgenommen und die organische Phase wurde mit Wasser (3x50 ml); NaHCO₃ ges. (1x 50 ml) und NaCl ges. (1x 50 ml) gewaschen. Danach wurde über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und am Rotavapor eingedampft. Zurück blieb ein weißer Schaum **2** (1,146 g, 62%). Dieser wurde über Nacht im Exsikkator unter Vakuum getrocknet.

Reaktion 2: Umsetzung zum Phosphoramidit für Festphasensynthese



Das benzylierte 2'-O-Aminohexyl-adenosinderivat **1** (1,146 g; 1,138 mmol) wurde unter Argon bei Raumtemperatur in 18 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Nach 10 minütigem Kühlen wurde 2-Cyanoethyl-N, N, N', N'-tetraisopropylphosphordiamidit (640 µl; 2,015 mmol) hinzuge tropft. Um die Reaktion zu starten, wurde 0,45 M Tetrazol in ACN (4,0 ml; 1,801 mmol) hinzugefügt und 24 h bei RT gerührt.

Danach wurde die Reaktion mit 30 ml NaHCO₃ ges. gestoppt. Das Gemisch wurde mit DCM (3x 50 ml) extrahiert wobei die organischen Phasen gesammelt wurden. Anschließend wurde die organische Phase mit NaCl ges. (1x100 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und am Rotavapor eingedampft. Zurück blieb ein weißer Film (Rohprodukt von **2**; 850 mg).

Dieser wurde in etwas LM2 (siehe S.22) gelöst und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Die gesammelten Fraktionen wurden vereint und eingedampft. Der Rückstand wurde in 75 ml MTBE aufgenommen und die organische Phase wurde mit NaHCO₃ ges. und Wasser (3x 50 ml+ 3x je 2 ml) und NaCl ges. (1x 50 ml) gewaschen. Danach wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und am Rotavapor eingedampft. Zurück blieb ein weißer Schaum **2** (755 mg, 55%). Dieser wurde über Nacht im Exsikkator unter Vakuum getrocknet. Danach wurde der Exsikkator mit Argon belüftet, der Kolben gut verschlossen, mit Parafilm abgedichtet und im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

Säulenflüssigchromatographie:

Eine entsprechende Menge an unbehandeltem Kieselgel (ca. 100 g) wurde in einen Erlenmeyerkolben eingewogen. Das Kieselgel wurde mit dem entsprechenden Laufmittel (ca. 250 ml) aufgeschwemmt und der Kolben während 15 Minuten immer wieder gut geschwenkt. Danach wurde die Säule unter gleichmäßigem Klopfen befüllt. Bevor die Probe aufgetragen wurde, wurde die Säule mit 300 ml des Laufmittels gewaschen.

Mobile Phase: LM 1: Triethylamin-Petrolether-Dichlormethan (1:15:10)

LM 2: Triethylamin-Petrolether-Dichlormethan (1:10:5)

NMR-Spektroskopie:

Vorbereitung der Probe:

10 mg der Probe wurden in eine Phiole eingewogen und in 800 μ l CDCl_3 gelöst. Die Lösung wurde durch Watte in ein NMR-Probenröhrchen filtriert und vermessen.

Analyse

Reaktion 1:

Rf 0,23 (MeOH/DCM 1:60)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,644 (s, 1H, H-2); 8,164 (s, 1H, H-8); 7,844 (d; 4H, Bz-2,6); 7,824 (d, 2H, Pht-4,7); 7,700 (dd, J = 3,15 Hz, 2H, Pht-5,6); 7,490 (t, J = 7,25 Hz, 2H, Bz-4); 7,359 (dd, J = 7,88, 4H, Bz-3,5); 7,326-7,231 (m, 5H, DMT-Ph-2-6); 7,170 (d, 4H, DMT-Ar-2,6); 6,829 (d, 4H, DMT-Ar 3,5); 5,943 (d, 1H, H-1'); 4,723 (dd; J = 4,75 Hz, 1H, H-2'); 4,539 (d; 1H, H-3') 4,360 (s, 1H, H-4'); 3,964 (dd, J = 1,58 Hz, 1H, H-5'/1), 3,796 (s, 6H, OCH_3); 3,3689 (dd, 1H, H-5'/2); 3,664 (t, J = 7,25 Hz, 2H, H-6''); 3,511-3,375 (m, 2H, H-1'') 1,657-1,307 (m, 8H, H-2'',3'',4'',5'')

^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 172,17 (Bz-CON); 168,48 (Pht-CON); 158,63 (DMT-Ar-4); 152,78 (C-6); 151,75 (C-4); 151,60 (C-2); 147,31 (DMT-Ph-1); 144,96 (C-8); 139,46 (DMT-Ar-1); 133,92 (Bz-1) 133,89 (Pht-5,6); 133,13 (Bz-4), 132,10 (Pht-3a,7a); 129,48 (Bz-2,6); 129,11 (DMT-Ar-2,6); 128,77 (Bz-3,5); 127,84 (DMT-Ph-2,6); 127,75 (DMT-Ph-3,5); 123,07

(DMT-Ph-4); 123,19 (Pht-4,7); 113,16 (DMT-Ar-3,5); 89,76 (C-1'); 88,01 (C-4'); 81,41 (DMT-Cq); 81,27 (C-2'); 71,49 (C-1''); 70,71 (C-3'); 63,11 (C-5'); 55,23 (DMT-OCH₃); 37,63 (C-6''); 29,42 (C-2''); 28,27 (C-5''); 26,47 (C-4''); 25,27 (C-3'')

Reaktion 2:

R_f = 0,31 (Triethylamin/Petrolether/Dichlormethan 1:10:5)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), Diastereomere: δ = 8,30 und 8,29 (s, 1H, H-2); 8,01 und 7,97 (s, 1H, H-8); 7,59-7,53 (m, 6H, Bz-2,6; Pht-4,7); 7,42 (dd, J = 5,35 und 2,85 Hz, 2H, Pht-5,6); 7,20-7,12 (m, 4H, Bz-4; DMT-Ph-2,6); 7,08-6,88 (m, 11H, Bz-3,5; DMT-Ar-2,6; DMT-Ph-3,4,5); 6,54-6,50 (m, 4H, DMT-Ar-3,5); 5,87 und 5,85 (d, J = 5,40 und 5,35 Hz, 1H, H-1'); 4,45 und 4,41 (t, J = 5,00 Hz, 1H, H-2'); 4,30 (m, 1H, H-3'); 4,14 und 4,09 (dd, J = 7,9 und 4,1 Hz, 1H, H-4'); 3,68 (m; 1H, H-1*); 3,48 (s, 6H, OCH₃); 3,44-3,14 (m, 8H, H-1*; H-1''; H-6''; iPrCH; H-5'/1); 3,06-3,02 (m, 1H, H-5'/2); 2,39-2,35 (m, 1H, H-2*/1); 2,11-2,08 (m, 1H, H-2*/2); 1,45-1,20 (m, 4H, H-5'', H-2''); 1,10-1,01 (m, 4H, H-3'', H-4''); 0,91 und 0,90 (d, J = 6,95 Hz, iPrCH₃).

¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 172,25 (Bz-CON); 168,39 (Pht-CON); 158,53 (DMT-Ar-4); 152,86 (C-4); 152,12 (C-2); 151,73 (C-6); 144,43 (DMT-Ph-1); 143,81 (C-8); 135,60 (DMT-Ar-1); 134,05 (Bz-1); 133,82 (Pht-5,6); 132,88 (Bz-4); 132,12 (Pht-3a,7a); 130,06 (DMT-Ar-2,6); 129,42 (Bz-2,6); 128,65 (Bz-3,5); 128,21 (C-5); 128,11 (DMT-Ph-2,6); 127,82 (DMT-Ph-3,5); 126,89 (DMT-Ph-4); 123,14 (Pht-4,7); 117,48 (-CN); 113,14 (DMT-Ar-3,5); 87,23 (C-1'); 86,52 (DMT-Cq); 83,78 (C-4'); 80,36 (C-2'); 71,02 (C-1''); 70,86 (C-3'); 62,78 (C-5'); 58,32 (C-1*); 55,20 (DMT-OMe); 43,23 (iPrCH); 37,84 (C-6''); 29,49 (C-2''); 28,43 (C-5''); 26,59 (C-4''); 25,48 (C-3''); 24,58 (iPrCH₃); 20,25 (C-2*).

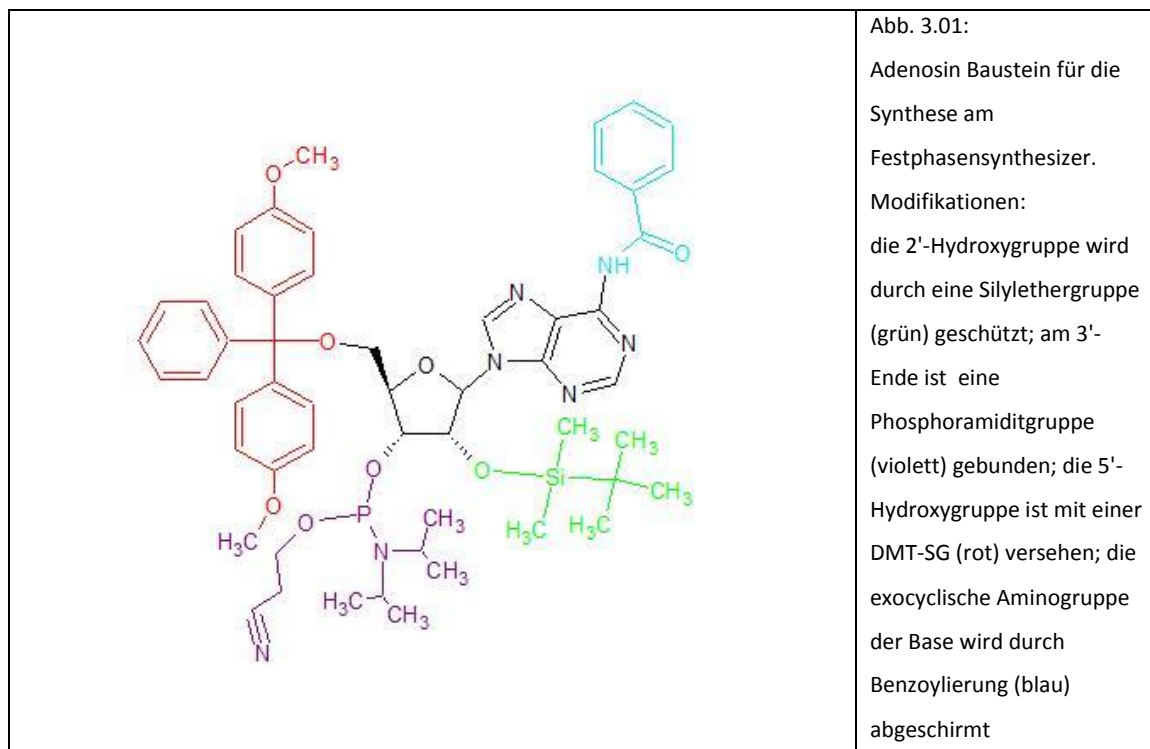
3.2. Synthese, Entschützung und Aufreinigung der siRNA

3.2.1. Synthese am Festphasensynthesizer

Die Synthese der Luciferase siRNA Antisense Stränge erfolgte am 10-Säulen RNA/DNA-Synthesizer (PolyGen). Als feste Phase wurde Controlled Pore Glass (CPG) verwendet, an das bereits das erste Nukleotid gebunden war.

Abgesehen vom modifizierten 2'-Aminohexyl-adenosin **2** hatten alle Nukleotide folgende Schutzgruppen: eine Silylethergruppe in 2'-Position; eine Cyanoethylgruppe am Phosphor der Phosphoramiditgruppe am 3'-Ende, und eine DMT-Gruppe in 5'-Position. Außerdem waren die exozyklischen Aminogruppen der Basen durch Acylierung geschützt (siehe Abb. 3.01).

Beim modifizierten Baustein unterschied sich die Schutzgruppe in 2'-Position. Hier wurde die Aminogruppe des Aminohexyl-Linkers in 2'-Position durch eine Phthalimidgruppe geschützt (siehe Abb.5.01).



Die Oligonukleotidsynthese erfolgte am RNA-/DNA-Festphasensynthesizer (PolyGen). Sie wurde vollautomatisch laut Standardprotokoll durchgeführt und ist in (23) vollständig beschrieben.

Der Reaktionszyklus lässt sich grob in 4 Schritte gliedern:

- A. Zunächst erfolgt die Detritylierung der säurelabilen 5'-Hydroxyschutzgruppe, wobei die entstandenen orange gefärbten Tritylkationen der photometrischen In-Prozess-Kontrolle dienen.
- B. Dann wird der Phosphoramiditbaustein mittels Aktivator (z.B. Tetrazol) aktiviert und an die freie 5'-Hydroxygruppe des vorhergehenden Nukleotids gekoppelt.
- C. Im nächsten Schritt erfolgt das sogenannte Capping. Hier werden noch freie 5'-Hydroxygruppen blockiert.
- D. Im letzten Schritt erfolgt die Oxidation vom Phosphittriestern zum Phosphattriestern mittels $I_2/H_2O/Pyridin$.

3.2.2. Abspaltung, Entschützung und Ausfällung

Nach der Synthese wurde die feste Phase aus dem Synthese-Slider in ein Vial überführt. Es wurden 2,5 mg des beladenen CPG entnommen und in ein Eppendorfgefäß mit Schraubverschluss eingewogen. Zunächst wurde das Harz mit 1 ml einer 5% -igen Hydrazinlösung (5% Hydrazinhydrat in ACN/EtOH 100% 1:1) versetzt und 15 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde der Überstand abpipettiert, wobei eine Glasfritte zu Hilfe genommen wurde, um die flüssige von der festen Phase zu trennen. Das CPG wurde 3x mit je 50 µl EtOH 96% (unvergällt) gewaschen und anschließend unter Vakuum mittels Speed-Vac 15 min getrocknet.

Das trockene CPG wurde mit 1 ml AMA (NH₄OH/wässriges Methylamin 1:1) versetzt und bei 65°C 30 min lang geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand, nach kurzem Abkühlen, in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Der Rückstand wurde 3x mit je 50 µL Nuklease-freiem Wasser nachgewaschen. Dann wurde der Überstand vollständig eingedampft.

Für die Entsilylierung der 2'- Hydroxygruppen wurde das entstandene Pellet in 30 µl DMSO gelöst, mit 30 µl TEA.3HF versetzt, gut durchgemischt und dann für 2,5 h auf 65°C erhitzt. Dann wurde 10 min bei -20°C abgekühlt.

Ausfällung:

Die Lösung wurde mit 2 µl eines 3 M Natriumacetat Puffer in Nuklease-freiem Wasser versetzt. Dann wurden 500 µl Isopropanol hinzugefügt, gut durchgemischt und über Nacht bei -70°C ausgefällt.

Danach wurde für 15 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Das Pellet wurde mit 300 µl Isopropanol versetzt, gut durchgemischt, zentrifugiert und der Überstand anschließend dekantiert. Dieser Vorgang wurde 2x wiederholt. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl 10 mM AA Puffer gelöst.

Die Absorption bei 260 nm wurde mittels NanoDrop Spektrophotometer bestimmt. Die Konzentration wurde mittels Lambert Beertschen Gesetz berechnet, die Lösung auf 100 µM verdünnt und bei -70°C aufbewahrt. (Ausbeute ca. 15 nmol)

3.3. Synthese, Entschützung und Aufreinigung der SSO

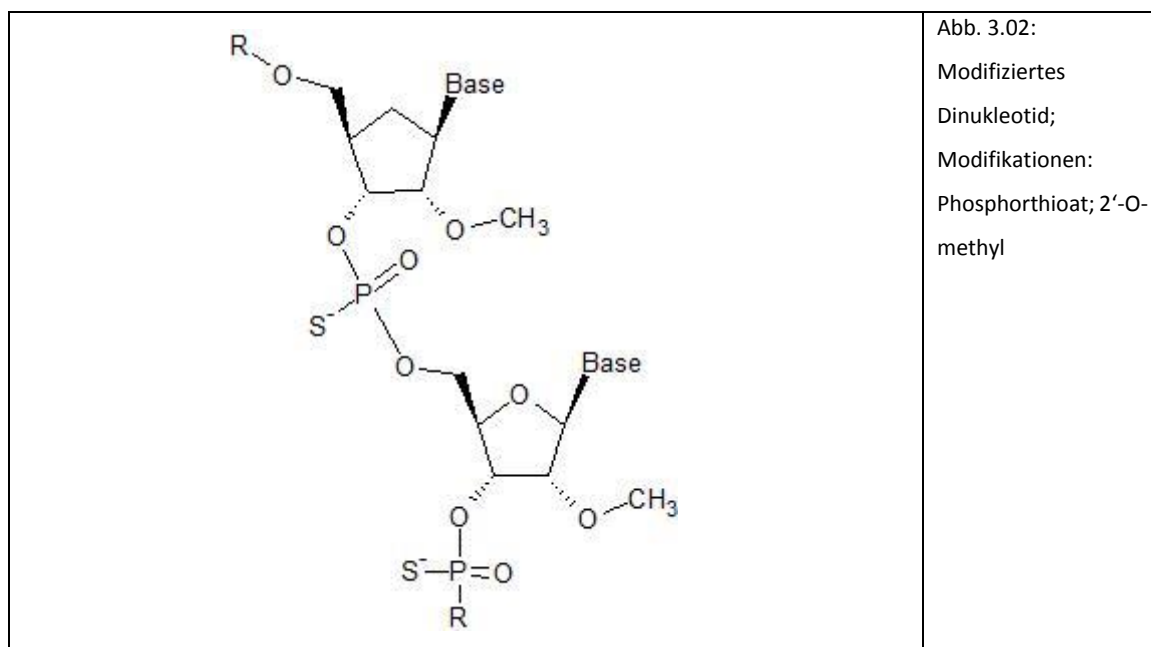
3.3.1. Synthese am Festphasensynthesizer

Die Synthese der Luciferase splice switching Oligonukleotide erfolgte vollautomatisch am 10-Säulen RNA/DNA-Synthesizer (PolyGen). Als feste Phase wurde Amino-ON- CPG (SAFC) verwendet. Dabei handelt es sich um ein modifiziertes Harz, durch das ein Aminohexyl-Linker in 3'-Position des ersten Nukleotids eingeführt werden konnte.

Der Oxidationsschritt des Reaktionszyklus (siehe S.25) wurde hier mittels Sulfurisierungsreagenz (z.B. TEDT) durchgeführt, wodurch Phosphorthioate entstanden.

Abgesehen vom modifizierten Aminohexyl-adenosin hatten alle Nukleotide folgende Schutzgruppen: eine Cyanoethylgruppe am Phosphor der Phosphoramiditgruppe am 3'-Ende; eine DMT-Gruppe in 5'-Position. Die Aminogruppen der Basen waren durch Acylierung geschützt. Außerdem waren die Bausteine in 2'-Position methoxyliert.

Beim modifizierten Baustein unterschied sich die Schutzgruppe in 2'-Position: hier wurde die Aminogruppe des Aminohexyl-Linkers in 2'-Position durch eine Phthalimidgruppe geschützt (siehe Abb.5.01).



3.3.2. Abspaltung, Entschützung und Ausfällung

Nach der Synthese wurde die feste Phase aus dem Synthese-Slider in ein Vial überführt. Es wurden 1,0 mg des beladenen Harzes entnommen und in ein Eppendorf-Schraubgefäß eingewogen.

Das beladene Harz wurde mit 1 ml einer 2%-igen Hydrazinlösung (2% Hydrazin in EtOH 100%) versetzt und bei Raumtemperatur 2 Stunden geschüttelt. Danach wurde der Überstand abpipettiert, wobei eine Glasfritte zu Hilfe genommen wurde, um die flüssige von der festen Phase zu trennen. Das Harz wurde 3x mit je 50 µl EtOH 96% (unvergällt) gewaschen und anschließend getrocknet.

Das trockene Harz wurde mit 1 ml AMA versetzt und bei 65°C 60 min lang geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand, nach kurzem Abkühlen, in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Der Rückstand wurde 3x mit je 50 µL Nuklease-freiem Wasser nachgewaschen. Dann wurde der Überstand vollständig eingedampft.

Ausfällung:

Das Pellet wurde in 30 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und die Lösung wurde mit 2 µl eines 3 M Natriumacetat Puffer in Nuklease-freiem Wasser versetzt. Dann wurden 300 µl Isopropanol hinzugefügt, gut durchgemischt und über Nacht bei -70°C ausgefällt. Danach wurde für 15 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Das Pellet wurde mit 300 µl Isopropanol versetzt, gut durchgemischt, zentrifugiert und anschließend dekantiert. Dieser Vorgang wurde 2x wiederholt. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl 10 mM AA Puffer gelöst.

Die Absorption bei 260 nm wurde mittels NanoDrop Spektrophotometer bestimmt. Die Konzentration wurde mittels Lambert Beertschen Gesetz berechnet und die Lösung auf 100 µM verdünnt. (Ausbeute ca. 8 nmol)

3.4. Entsalzen der Oligonukleotide und deren Konjugate

Ausfällen mittels Isopropanol

Für die Analyse mittels ESI-MS wurden 20 µl der 100 µM Lösung lyophilisiert. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl 10 mM AA Puffer gelöst. Dann wurden 200 µl Isopropanol hinzugefügt und über Nacht bei -70°C ausgefällt. Am nächsten Tag wurde 30 min bei 0°C und 17,400 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Isopropanol dekantiert und das Pellet mit 100 µl Isopropanol gewaschen. Anschließend wurde 20 min zentrifugiert und der Überstand erneut dekantiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Danach wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl 10 mM AA Puffer gelöst. Die Absorption wurde bestimmt und die Konzentration berechnet.

Für die Analyse mittels ESI-MS wurde eine 10 µM Lösung verwendet.

Reinigung mittels Gelfiltration

Es wurde eine Säule mit Sephadex G-25 gefüllt und mit 10 mM AA-Puffer gewaschen. Die Probe wurde auf das Gel pipettiert und mittels Puffer eluiert. Es wurden Fraktionen von je 500 µl gesammelt. Die Absorption dieser Fraktionen wurde mittels NanoDrop Spektrophotometer gemessen. Jene Fraktionen die eine typische Absorptionskurve bei 260 nm zeigten, wurden lyophilisiert, in einer geeigneten Menge an Puffer gelöst und mittels HPLC analysiert.

3.5. Kopplung mit NHS-aktivierten PEG-Ketten

Die Reaktion wurde unter leicht alkalischen Bedingungen (pH 7-9) durchgeführt.

Zunächst wurden 30 µl der 100 µM Oligonukleotid-Lösung lyophilisiert. Das Pellet wurde anschließend in 20 µl PBS aufgenommen. Eine Stammlösung von MS(PEG)₈ in DMF wurde hergestellt. Hiervon wurden 100 Äquivalente (300 nmol) der Menge des Oligonukleotids der Oligonukleotidlösung zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 15 h bei RT geschüttelt. Die Reaktion wurde mittels HPLC und PAGE kontrolliert.

3.6. Analytik der Oligonukleotide und der Konjugate

3.6.1. Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Herstellung eines 20%-igen Acrylamid-Gel:

4,5 g Harnstoff wurden mit 1 ml 10xTBE (Tris-borat-EDTA-Puffer) und 5 ml Acrylamid-Stammlösung (40%; Acrylamid:bis-Acrylamid 29:1; Serva) versetzt. Um den Harnstoff vollständig zu lösen, wurde in der Mikrowelle für einige Sekunden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden der Lösung 5,0 µl TEMED und 50 µl APS hinzugefügt und sofort in die Apparatur gegossen. Mit Hilfe eines Kamms wurden 10 Taschen geformt.

Nach der Polymerisation erfolgte ein Vorlauf des leeren Gels für 30 min bei 150 V. Als Puffer wurde 1xTBE verwendet.

Vorbereitung der Proben:

1 nmol jeder Probe wurde mit 10 µl eines Formamidpuffers versetzt und 3 min auf 95°C erhitzt. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Die Proben wurden mit Hilfe einer Hamilton Pipette aufgetragen. Als Marker fungierte Bromphenolblau. Das Gel wurde bei 150 V solange laufen gelassen, bis der Marker 2/3 der Gelstrecke erreicht hatte.

Methylenblaufärbung:

Nach dem Lauf wurde das Gel in eine 0,02% Methylenblaulösung (in TBE) gelegt, und so lange gefärbt, bis die Banden erkennbar waren (ca. 30 min). Die Färbelösung wurde entfernt und das Gel durch Waschen mit Wasser entfärbt, bis scharfe Oligonukleotidbanden zu erkennen waren.

3.6.2. High performance liquid chromatography (HPLC)

Die HPLC wurde zur Analyse der Oligonukleotide und deren Konjugate verwendet.

Sie wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Mobile Phase A: 10 mM Ammoniumacetatpuffer (AA)
- Mobile Phase B: Acetonitril
- Gradientenelution von 30% B bis 100% B während 45 min und einer Flussrate von 1 ml/min;
- Säule: Synergi 4u Fusion-RP 4 micron 150 x 4.6 mm (Phenomenex)
- Säulentemperatur: Raumtemperatur
- UV Detector bei 260 nm

3.6.3. Elektronensprayionisation-Massenspektrometrie (ESI- MS)

Die Oligonukleotide wurden wie beschrieben (siehe Punkt 3.4) aufgearbeitet.

Die Messung wurde mit einem micrOTOF-Q II Massenspektrometer (Bruker) durchgeführt. Für die Analyse wurden 10 µl einer 10 µM Oligonukleotid Lösung in 10 mM Ammoniumacetat verwendet.

4. Resultate

4.1. Oligonukleotidsynthese

4.1.1. Splice switching Oligonukleotide (SSO)

Es wurden Luciferase Antisense Oligonukleotide synthetisiert, die sich durch die Anzahl an eingebauten 2'-Aminohexyl-adenosin unterschieden. Als feste Phase wurde anstatt des herkömmlichen CPG Amino-ON-CPG verwendet, wodurch am 3'-Ende des Oligonukleotids noch ein zusätzlicher Aminohexyl-Linker eingefügt werden konnte. Somit entstanden die in Tabelle 4.01 angeführten splice switching Oligonukleotide.

Oligonukleotid Nummer	Oligonukleotid-Sequenz	Modifikation
1	5'-CCU-CUU-ACC-UC*2'A*-GUU-AC*3'A*-3'	2 Modifikationen
2	5'-CCU-CUU-*2'A*CC-UC*2'A*-GUU-AC*3'A*-3'	3 Modifikationen
3	5'-CCU-CUU-*2'A*CC-UC*2'A*-GUU-*2'A*C*3'A*-3'	4 Modifikationen

Tabelle 4.01: synthetisierte Luciferase SSO Antisensestränge: Oligonukleotid -Sequenzen und Modifikationen; A: Adenosin; 2'A: 2'-Aminohexyladenosin; 3'A: 3'-Aminohexyladenosin; C: Cytidin; G: Guanotin; U: Uridin

4.1.2. siRNA

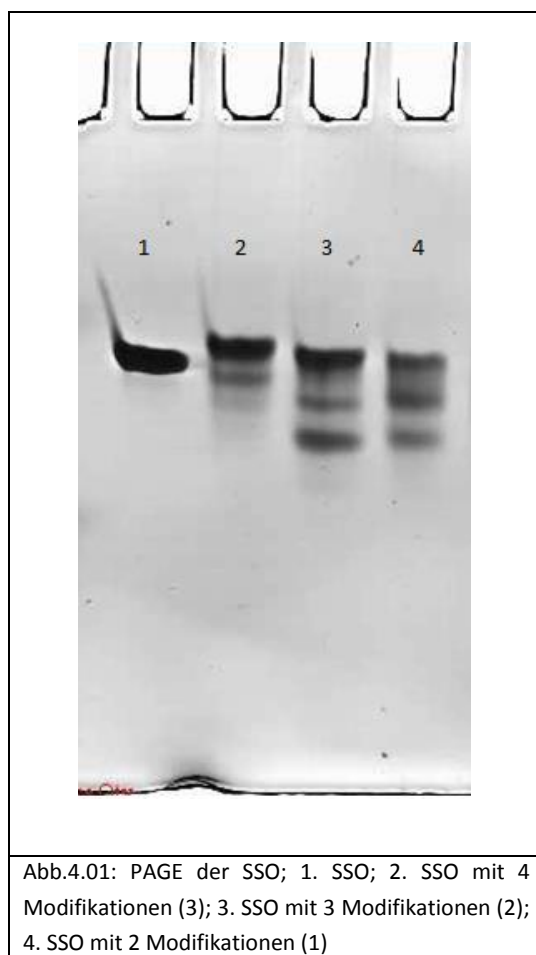
Es wurden Luciferase siRNA Antisense Stränge synthetisiert, die sich nur durch die Anzahl an eingebauten 2'-Aminohexyl-adenosin unterschieden. Als feste Phase wurde CPG verwendet, an welches bereits das erste Nukleotid gebunden war. Somit entstanden die in Tabelle 4.02 angeführten siRNA Oligonukleotide.

Oligonukleotid Nummer	Oligonukleotid-Sequenz	Modifikation
4	UCG-AAG-UAC-UCA-GCG-U*2'A*A-GTT	1 Modifikationen
5	UCG-AAG-UAC-UC*2'A*-GCG-U*2'A*A-GTT	2 Modifikationen
6	UCG-AAG-U*2'A*C-UC*2'A*-GCG-U*2'A*A-GTT	3 Modifikationen
7	UCG-*2'A*AG-U*2'A*C-UC*2'A*-GCG-U*2'A*A-GTT	4 Modifikationen

Tabelle 4.02: synthetisierte Luciferase siRNA Antisensestränge: Oligonukleotid -Sequenzen und Modifikationen; A: Adenosin; 2'A: 2'-Aminohexyladenosin; C: Cytidin; G: Guanotin; U: Uridin; T: Thymin

4.2. Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Die Gelelektrophorese wurde zur Analyse der Reinheit und der Identität der Oligonukleotide eingesetzt. Die selbst synthetisierten, modifizierten SSO wurden mit einem 3'-Aminohexyl-SSO derselben Sequenz (GSK) verglichen.

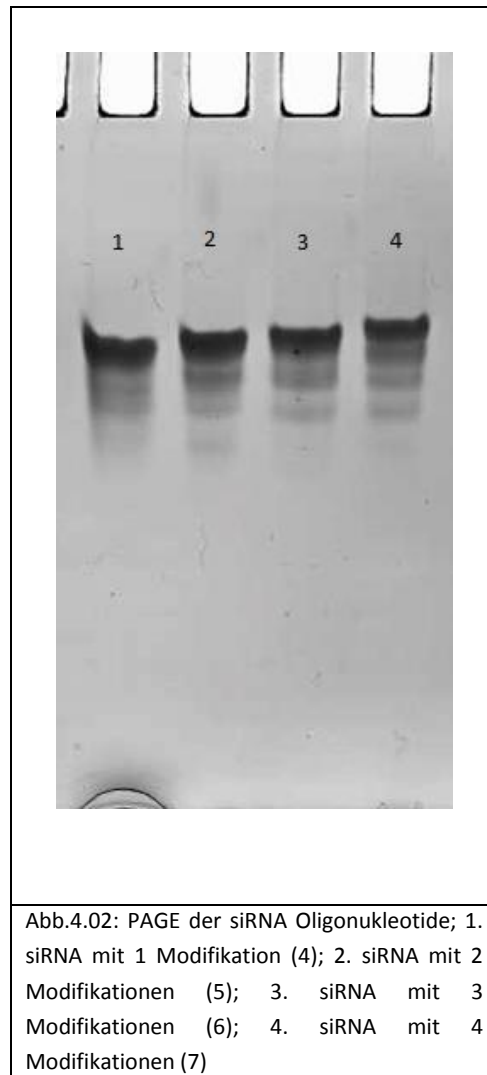


Bei Abbildung 4.01 ist zu sehen, dass alle selbstsynthetisierten, modifizierten Oligonukleotide (2), (3) und (4) um eine Spur langsamer wandern als das unmodifizierte SSO (1). Dabei ist zu beachten, dass die SSO mit mehr Modifikationen (2) bzw. (3) jeweils weniger weit wandern, als jene mit weniger Modifikationen (3) bzw. (4). Dies ergibt sich aus dem höheren Molekulargewicht, das sich wiederum aus den angehängten 2'- und 3'-Aminohexyl-Linker ergibt. Durch die Auftrennung mittels Gelelektrophorese entsteht ein Stufenmuster.

Während das SSO mit 4 Modifikationen (2) relativ rein erscheint, sind bei den SSO mit weniger Modifikationen (3) und (4) noch einige Fehlsequenzen zu sehen, die vor der

Analyse mittels HPLC bzw. vor der Konjugation noch mittels Sephadex- Gelfiltration (siehe Punkt 3.4) abgetrennt wurden.

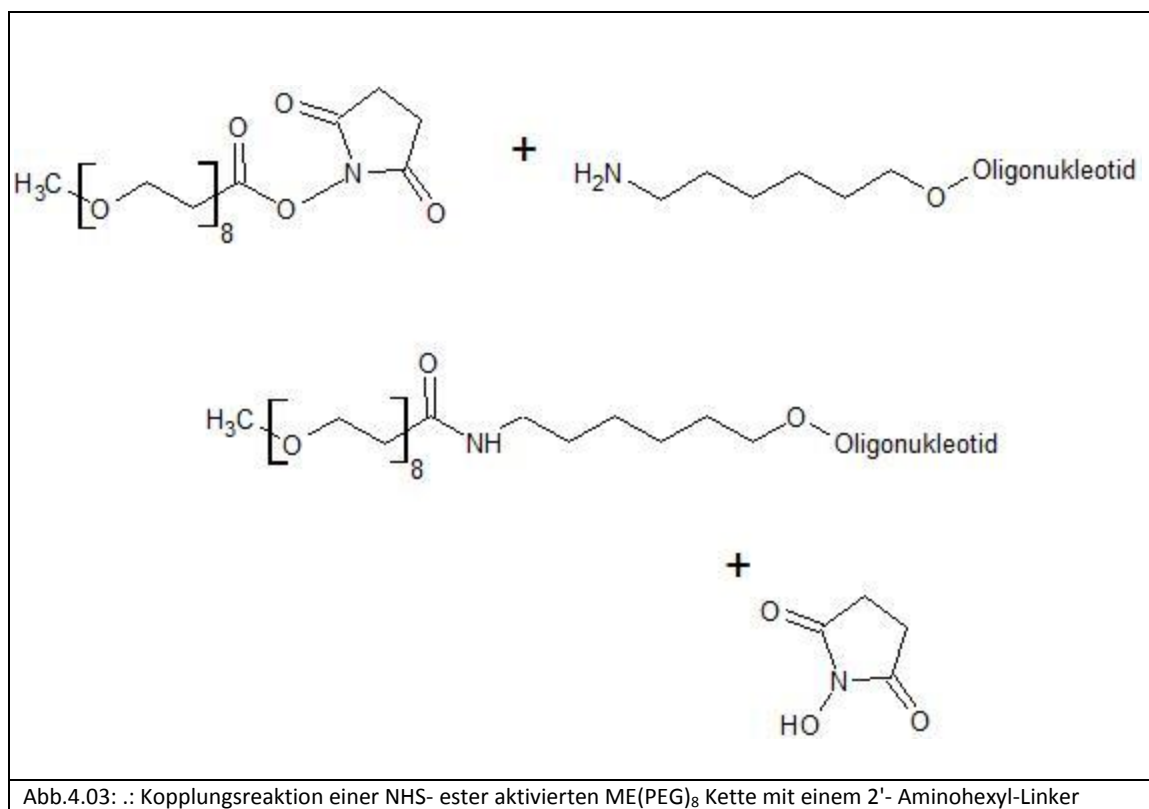
Auch die Reinheit der modifizierten siRNAs wurde mittels Gelelektrophorese analysiert.



Wie auch in Abbildung 4.01, ist in Abbildung 4.02 eine stufenweise Wanderung der modifizierten Oligonukleotide zu sehen. Diese ergibt sich aus der unterschiedlichen Anzahl der 2'-Aminohexyl-Linker und dem daraus resultierenden unterschiedlichen Molekulargewicht.

PEGylierung der Oligonukleotide:

NHS-ester aktivierte PEG-Ketten reagieren mit den Aminoethyl-Linker in 2'-Position der modifizierten Adenosin-Nukleotide und mit dem Aminoethyl-Linker am 3'-Ende des Oligonukleotids. Es entstehen kovalente Amidbindungen (Abb.4.03).



Im Rahmen der Diplomarbeit wurden nur die splice switching Oligonukleotide gekoppelt (Tab.4.01). Es entstanden die in Tabelle 4.03 angeführten Oligonukleotid-PEG-Konjugate.

Oligonukleotid Nummer	Oligonukleotid - Sequenz	Anzahl der PEG Ketten
8	5'-CCU-CUU-ACC-UC*2'-A*-GUU-AC*3'-A*-3'	2
9	5'-CCU-CUU-*2'A*CC-UC*2'-A*-GUU-AC*3'A*-3'	3
10	5'-CCU-CUU-*2'A*CC-UC*2'A*-GUU-*2'A*C*3'A*-3'	4

Tabelle 4.03: PEGylierte SSO: PEGylierte Oligonukleotid -Sequenzen; A: Adenosin; 2'A: 2'-pegyliertes Aminoethyladenosin (rot); 3'A: 3'-pegyliertes Aminoethyladenosin (rot); C: Cytidin; G: Guanosin; U: Uridin

Auch die PEGylierung der SSO wurde mittels Gelelektrophorese analysiert (Abb.4.06).

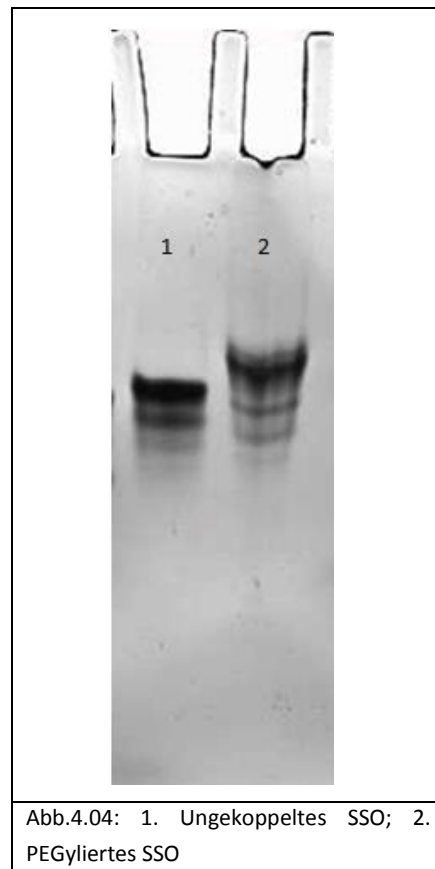


Abbildung 4.04 zeigt die Banden eines SSO vor der Konjugation mit PEG (1) und nach der Konjugation mit 100 Äquivalent aktiviertem PEG (2). Aufgrund des höheren Molekulargewichts, wandert das PEGylierte Oligonukleotid (2) langsamer, als das ungekoppelte SSO (1).

4.3. High performance liquid chromatography (HPLC)

Die Oligonukleotide wurden auch mittels HPLC analysiert. Dazu wurde eine geeignete Methode, angepasst an die Eigenschaften der Proben, ermittelt. Die synthetisierten Oligonukleotide und ihre Konjugate wurden unter Gradientenelution von Acetonitril (30-100%) analysiert.

Dabei ist zu beachten, dass die Peaks der SSO (Abb. 4.05 und 4.06) generell breiter sind, als jene der siRNA Oligonukleotide (Abb. 4.07). Dies liegt daran, dass die SSO als Phosphorthioate vorliegen. Durch die Substitution eines Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom am Phosphatrückgrat entsteht ein chirales Zentrum⁷. Dadurch entstehen viele (2^n) Diastereomere, die wiederum zu einem breiteren Peak führen.

4.3.1. SSO

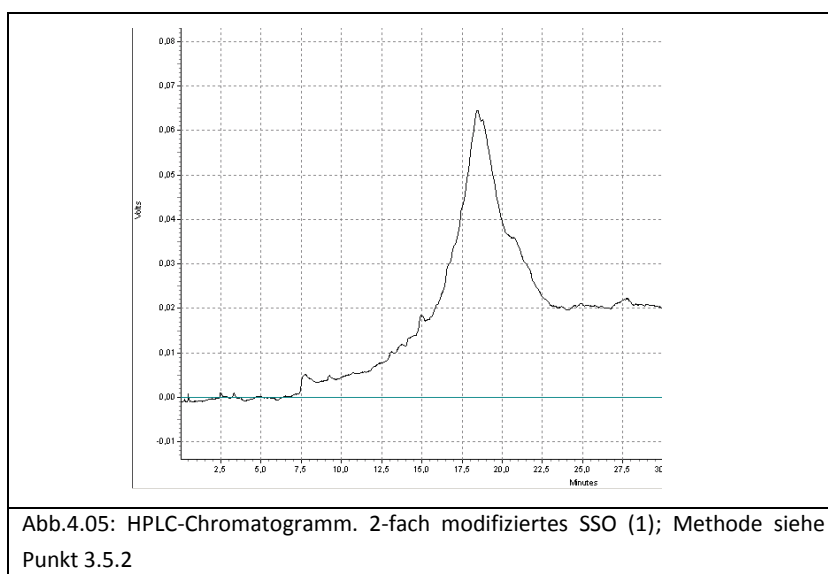


Abbildung 4.05. zeigt das Chromatogramm des 2-fach modifizierten SSO (1). Das Chromatogramm zeigt einen Peak bei einer Retentionszeit von 18,53 min. Die Entschützung und Aufreinigung mittels optimierter Methode hat offenbar gut funktioniert und zu einem reinen Produkt geführt. Dass es sich tatsächlich um das gewünschte Oligonukleotid handelt, wurde mittels ESI-MS bestätigt (Tab. 4.05).

Die PEGylierung der Oligonukleotide wurde ebenfalls mittels HPLC kontrolliert.

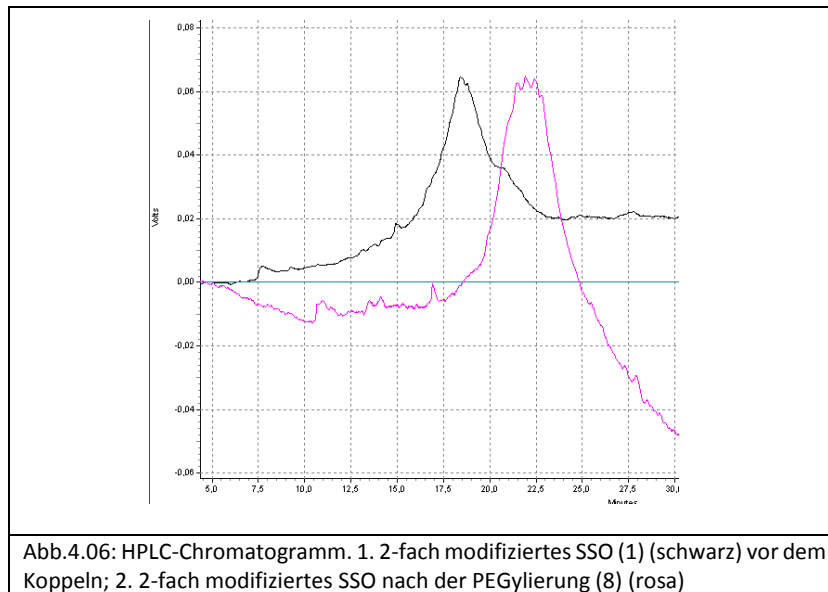


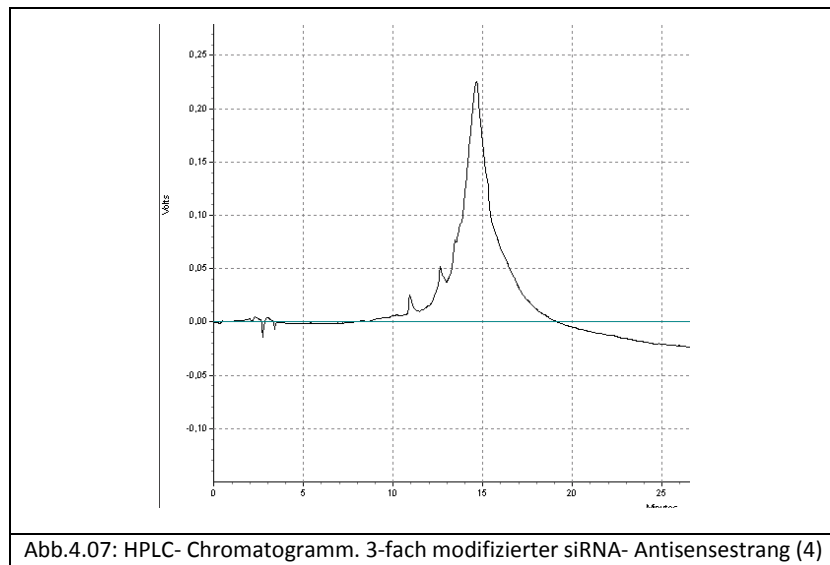
Abbildung 4.06 zeigt das Chromatogramm des 2-fach modifizierten SSO vor (1) und nach (2) der Konjugation mit den aktivierten PEG-Ketten. Durch Konjugation mit den PEG-Ketten werden die Oligonukleotide (2) polarer, weshalb sie stärker mit der stationären Phase wechselwirken als die ungekoppelten Oligonukleotide (1). Ein deutlicher Unterschied der Retentionszeit ist zu erkennen (ca. 3 Minuten (Tab.4.04)).

Sowohl vor, als auch nach der Konjugations-Reaktion ist jeweils nur ein Peak zu sehen, was dafür spricht, dass das ungekoppelte Oligonukleotid vollständig geschützt war und anschließend auch vollständig umgesetzt wurde.

Dies lässt sich durch die Massenspektren der Oligonukleotide und ihrer Konjugate bestätigen (Tab.4.05).

Auch die restlichen SSO (2) und (3) und ihre Konjugate (9) und (10) wurden mittels HPLC analysiert. Ihre Retentionszeiten sind in Tabelle 4.04 angeführt.

4.3.2. siRNA



Die modifizierten siRNA Oligonukleotide wurden ebenfalls mittels HPLC analysiert. Abbildung 4.07 zeigt das Chromatogramm des 3-fach modifizierten siRNA-Antisensestrang (4). Das Chromatogramm zeigt einen Peak bei einer Retentionszeit von 14,54 min. Die optimierte Methode zur Entschützung und Aufreinigung führte zu einem reinen Produkt, das mittels ESI-MS analysiert wurde.

Auch die restlichen siRNA Antisensestränge (5), (6) und (7) wurden mittels HPLC analysiert. Ihre Retentionszeiten sind in Tabelle 4.04 angeführt.

Oligonukleotid	Retentionszeit (min)	Oligonukleotid PEGyliert	Retentionszeit (min)
1	18,53	8	21,88
2	19,03	9	21,33
3	20,32	10	23,12
4	13,52		
5	14,03		
6	14,54		
7	15,11		

Tab.4.04: Analyse der Oligonukleotide. HPLC-Retentionszeiten der Oligonukleotide und ihrer Konjugate

4.4. Elektronensprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Oligonukleotide und ihre Konjugate wurden mittels ESI-MS analysiert. Die erhaltenen Spektren wurden folgendermaßen ausgewertet:

Zunächst wurde die Masse der Oligonukleotide anhand ihrer Sequenz ermittelt. Die gefundenen Masse-Peaks wurden multipliziert und mit der Masse der Oligonukleotide verglichen. In den Spektren konnten die angegebenen Oligonukleotide als Salz-Addukte (u.a. $+Na^+$, $+K^+$) gefunden werden. Die Massen wurden dementsprechend angepasst.

Oligonukleotid	Masse- Peak [M-x] ^{x-}	gefundene Masse	erwartete Masse
1	411,227 [16]	6364,577	6363,162
	475,155 [14]	6364,721	6365,178
3	401,081 [17]	6530,909	6532,464
	601,331 [11]	6538,156	6538,512
	767,146 [9]	6541,012	6540,528
6	472,977 [15]	6986,63	6986,69
	514,967 [14]	6986,35	
	644,866 [11]	6985,39	
8	448,530 [16]	7176,48	7176,2
9	502,637 [16]	7632,281	7631,67

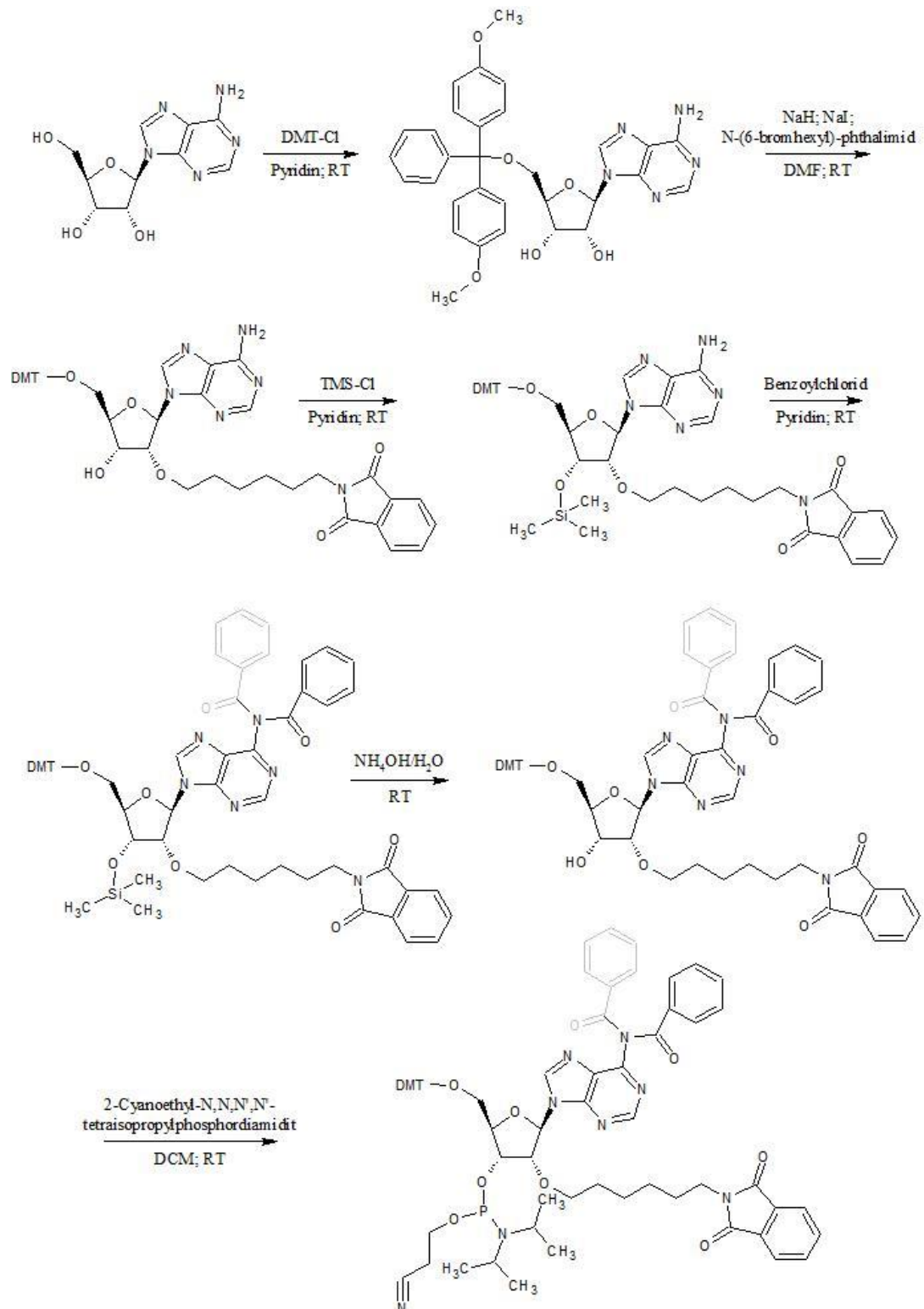
Tab.4.05: Analytik mittels ESI-MS; die angegebenen Oligonukleotide konnten als Salz-Addukte gefunden werden

Die erwarteten Massen der Oligonukleotide und ihrer Konjugate entsprachen den gefundenen Massen der Proben. Daraus wird geschlossen, dass die Oligonukleotide richtig synthetisiert und erfolgreich gekoppelt wurden.

5. Diskussion

5.1. Synthese von 2'-Aminohexyl-adenosin mit entsprechenden Schutzgruppen

Syntheschema:



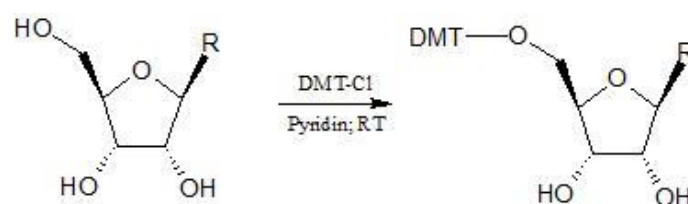
Ausgehend von einem Adenosin-Molekül, sollte ein modifizierter Adenosin-Baustein hergestellt werden, der für die Oligonukleotidsynthese am Festphasensynthesizer geeignet war. Die Standard-Methode bei dieser Festphasensynthese ist zurzeit ein Verfahren, bei dem die einzelnen Nukleotid-Bausteine als Phosphoramidite vorliegen²³.

Um einen gesteuerten Aufbau der Oligonukleotide am Synthesizer von 3' nach 5' zu gewährleisten, mussten reaktive Hydroxy- und Aminogruppen vor der Synthese mit geeigneten Schutzgruppen versehen werden.

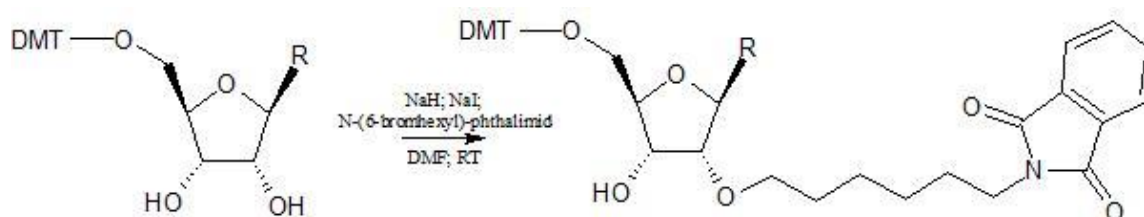
Da diese Schutzgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter verschiedenen Bedingungen wieder abgespalten werden müssen, ist die Wahl der Schutzgruppen für eine erfolgreiche Synthese essentiell. Während die Schutzgruppen in 3'- und 5'-Position schon während der Oligonukleotidsynthese abgespalten werden müssen, sollten die restlichen Schutzgruppen erst nach erfolgter Synthese abgespalten werden. Um eine selektive Abspaltung zu ermöglichen werden die Schutzgruppen aufgrund ihrer Eigenschaften ausgewählt. So ist die DMT-Schutzgruppe der 5'-OH-Gruppe leicht durch Säuren abspaltbar, während die Cyanoethyl-Schutzgruppe des Phosphors eine Basenlabilität aufweist. Die Schutzgruppen der Basen sollten so gewählt werden, dass sie während der Synthese nicht entfernt werden. Diese Schutzgruppen sind zumeist relativ stabil gegenüber Säuren und schwachen Basen. Nach der Synthese werden sie mittels starken Basen (AMA) entfernt.

Synthese¹⁵:

Das ursprüngliche Ausgangsprodukt war ein Adenosin-Molekül. Dieses wurde zunächst in 5'-Position mit einer säurelabilen Dimethoxytrityl-Schutzgruppe versehen. Da diese Schutzgruppe eine hohe Regioselektivität für die primäre 5'-OH-Gruppe aufweist, war eine vorübergehende Schützung der restlichen Hydroxygruppen nicht notwendig. Die Reaktion fand in wasserfreiem Pyridin bei Raumtemperatur statt. Als Reagens diente Dimethoxytritylchlorid.



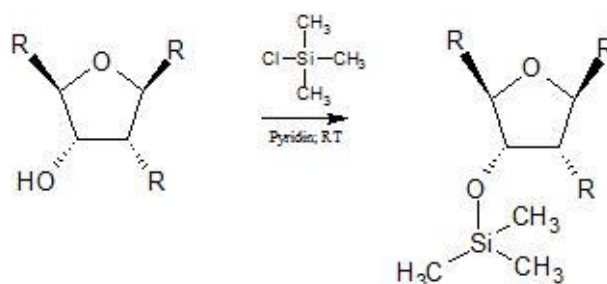
Um eine spätere PEGylierung in 2'-Position gewährleisten zu können, war es notwendig einen Linker in das Molekül einzubringen. Es wurde ein Aminohexyl-Linker gewählt, der mittels Ethersynthese in 2'-Position eingefügt werden sollte. Zunächst wurde mittels NaH aus dem Alkohol ein Alkoholat hergestellt. Dieses wurde mit N-(6-bromhexyl)-phthalimid umgesetzt. Natriumiodid diente als Katalysator. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur in Dimethylformamid durchgeführt.



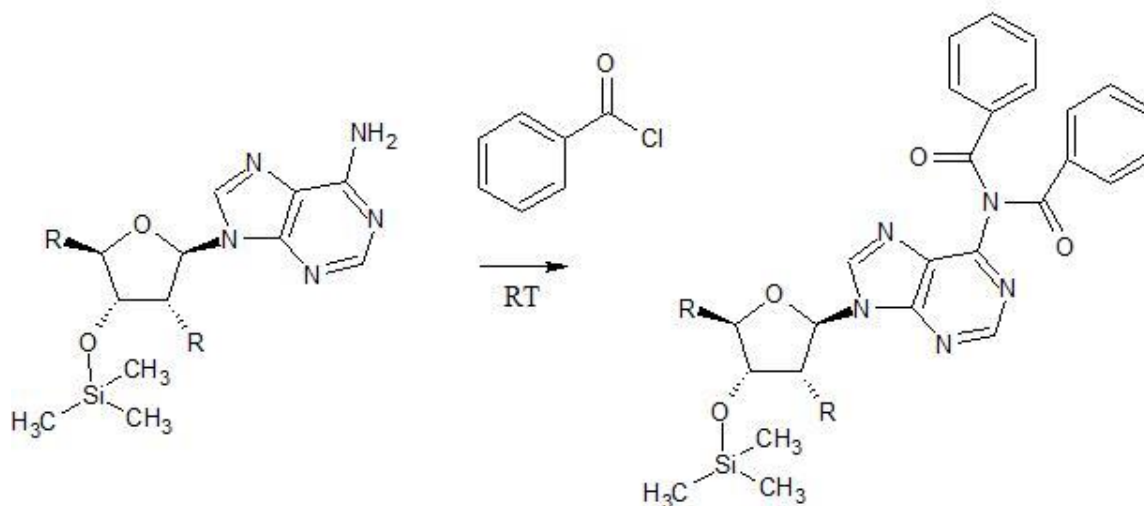
Dieses Molekül war das Ausgangsprodukt für die Arbeit, die im Laufe dieser Diplomarbeit durchgeführt wurde. Da die 5'-Tritylierung und die 2'-Alkylierung bereits erfolgreich waren, musste noch die exozyklische Aminogruppe der Base geschützt werden, bevor die Umsetzung zum Phosphoramidit durchgeführt werden konnte.

Da sowohl die Produkte als auch die Reagenzien zum Teil sehr hydrolyseempfindlich sind, wurde die gesamte Reaktion unter Argon durchgeführt und darauf geachtet möglichst luft- und wasserfrei zu arbeiten.

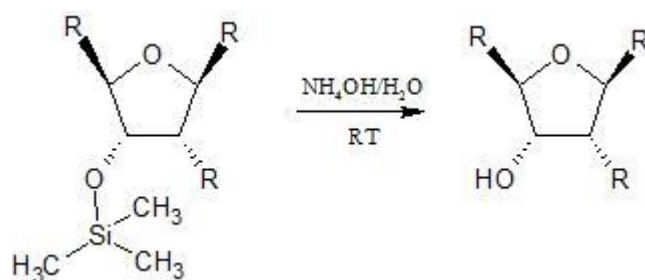
Um eine selektive Benzoylierung der exozyklischen Aminogruppe der Base durchführen zu können, musste zunächst die 3'-Hydroxygruppe mit einer reversiblen Schutzgruppe versehen werden. Durch das Hinzufügen von Chlortrimethylsilan kam es unter basischen Verhältnissen zu einer selektiven Silylierung der 3'-OH-Gruppe. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur in Pyridin.



Anschließend konnte die Benzoylierung der Aminogruppe durchgeführt werden. Hierzu wurde Benzoylchlorid verwendet. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur. Wie sich bei der Analyse mittels NMR herausstellte, kam es dabei zu einer Dibenzoylierung, was aber kein Problem darstellte.

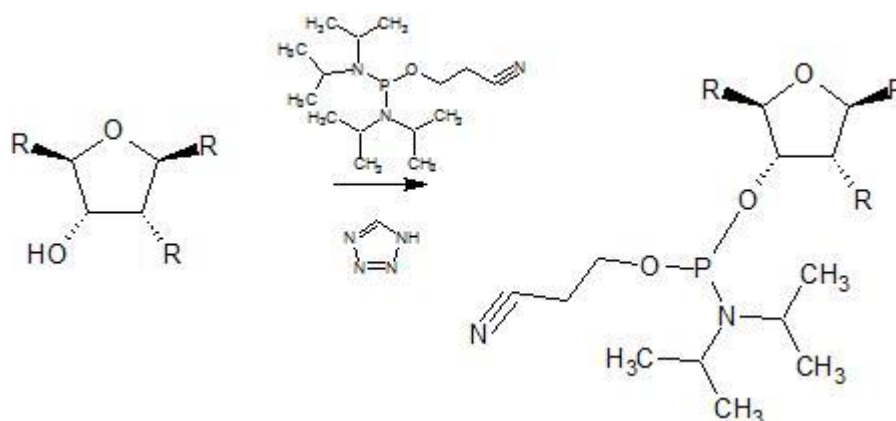


Nachdem die Benzoylierungs-Reaktion vollständig war, musste die Schutzgruppe in 3'-Position wieder abgespalten werden, um eine anschließende Umsetzung zum Phosphoramidit zu ermöglichen. Hierzu wurde eine wässrige Ammoniumhydroxyd-Lösung (28-30%) hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.



Das Zwischenprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Da es sich bei DMT um eine säurelabile Schutzgruppe handelt, musste das Kieselgel zunächst neutralisiert werden. Die Fraktionen wurden am Rotavapor eingedampft und anschließend über Nacht im Exsikkator unter Vakuum getrocknet.

Das trockene Produkt wurde in Dichlormethan gelöst und mit dem Reagens, 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphordiamidit, versetzt. Um die Reaktion zu katalysieren, wurde Tetrazol als Aktivator hinzugefügt. Diese Reaktion wurde ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt.



Das Edukt wurde trotz überschüssigen Phosphoramiditreagenzes zwar nicht vollständig umgesetzt (DC-Kontrolle), die Reaktion nach 24 Stunden dennoch gestoppt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt und das Produkt wurde vorsichtig am Rotavapor eingedampft und anschließend über Nacht im Exsikkator unter Vakuum getrocknet. Der Rundkolben mit dem Produkt wurde unter Luftausschluss bei -20°C gelagert.

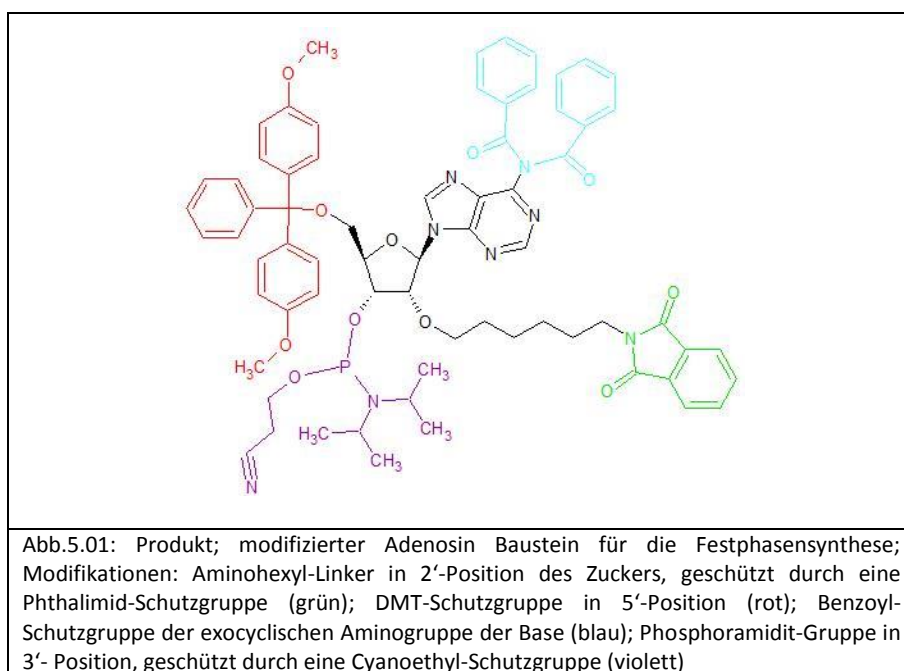


Abbildung 5.01 zeigt das Endprodukt der Synthese. Es entstand ein 2'-Aminohexyl-modifizierter Phosphoramidit-Baustein, der mit geeigneten Schutzgruppen für die Festphasensynthese versehen war.

Die Überwachung der Reaktions- und Aufreinigungsschritte erfolgte mittels DC. Dazu wurden unterschiedliche Laufmittel verwendet (siehe Punkt 3.1).

Durch geeignete Methoden war es möglich, reine Produkte zu gewinnen. Diese wurden mittels NMR-Spektroskopie analysiert.

Die Methode zur Herstellung des geschützten Phosphoramidit-Baustein erwies sich als geeignet. Die Herstellung des modifizierten Nukleotids war gut durchführbar und erfolgreich.

5.2. Synthese, Entschützung und Aufreinigung der Oligonukleotide

Synthese:

Für die Synthese am Festphasensynthesizer wurden die gewünschten Nukleotide, sowie der modifizierte Baustein möglichst luft- und wasserfrei in Acetonitril gelöst (ca. je 200 mg in 3 ml) und lt. Standardprotokoll am RNA/DNA Festphasensynthesizer synthetisiert. Die Synthese der Oligonukleotide war erfolgreich. Auch der Einbau des modifizierten Bausteins stellte kein Problem dar. Die Synthese wurde mittels Tritylanalyse kontrolliert.

Abspaltung und Entschützung:

Zunächst wurde die empfohlene Methode zur Entschützung und Abspaltung der Oligonukleotide (siRNA: AMA, 10 min bei 65 °C; SSO: AMA, 60 min bei 65°C) durchgeführt. Für gewöhnlich führt eine Behandlung mit AMA sowohl zu einer Abspaltung des Oligonukleotids vom Harz (Abb.5.02), als auch zur Abspaltung der Basenschutzgruppe (Abb.5.03).

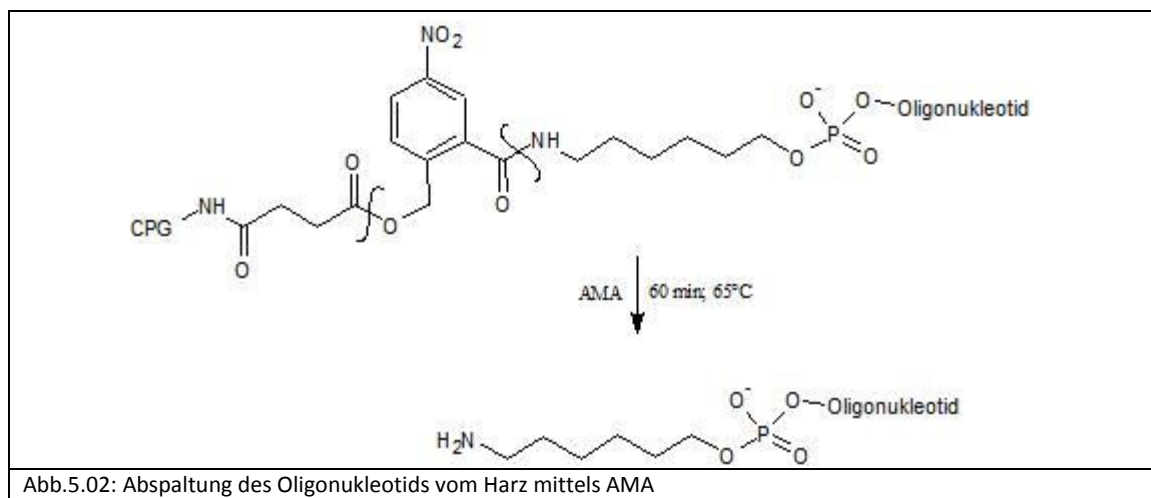
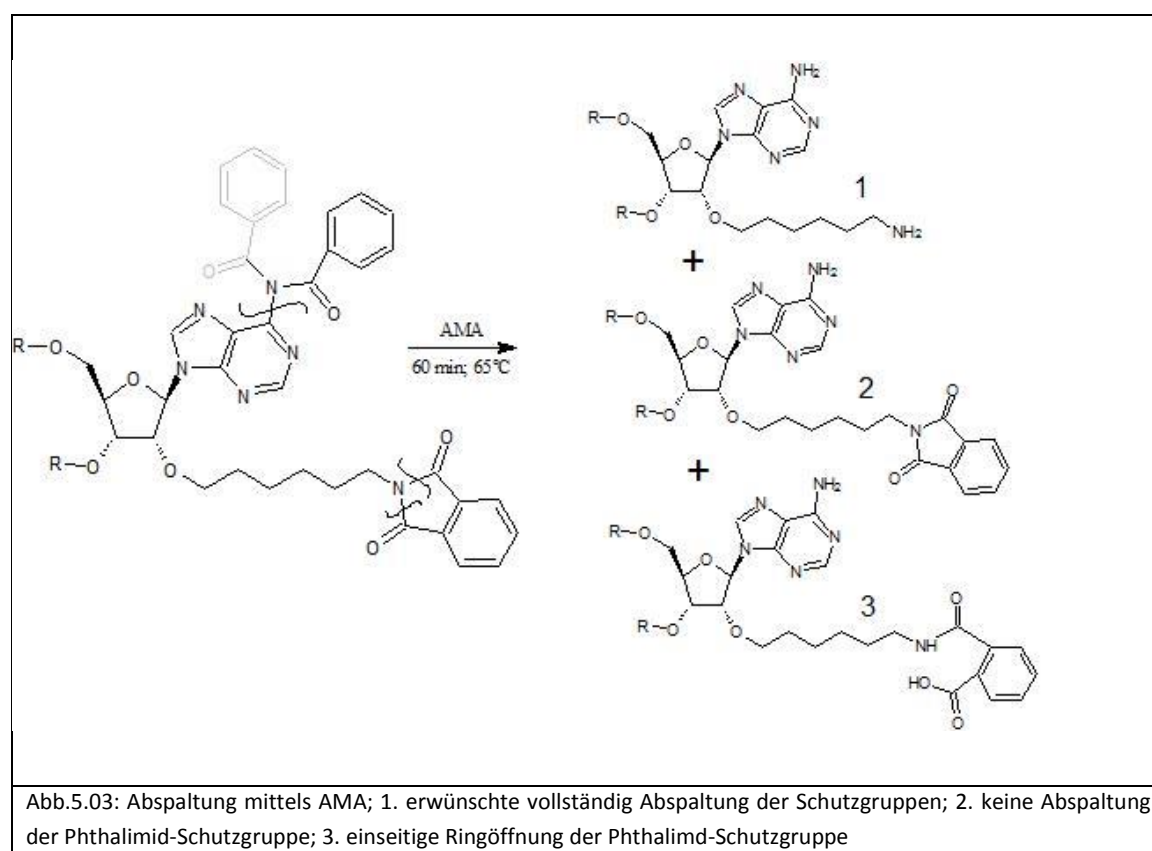


Abb.5.02: Abspaltung des Oligonukleotids vom Harz mittels AMA

Im Laufe der Diplomarbeit war es aber nicht möglich, die Oligonukleotide mit AMA vollständig zu entschützen. Sowohl bei der Analyse mittels Gelelektrophorese, als auch bei der Analyse mittels HPLC waren zahlreiche Banden bzw. Peaks zu sehen.

Da sich der modifizierte Baustein bezogen auf die Schutzgruppen nur durch die Phthalimid-Schutzgruppe von den gewöhnlichen Bausteinen unterschied, wurde vermutet, dass diese Schutzgruppe nicht vollständig abgespalten wurde. Da das

Chromatogramm zahlreiche Peaks zeigte, wurde auch eine einseitige Öffnung des Phthalimid-Ringes in Betracht gezogen (Abb.5.03).



Um eine Kopplung zu gewährleisten, musste die Aminogruppe des Linkers freiliegen. Daher war es notwendig die Phthalimid-Schutzgruppe zu entfernen.

Zunächst wurde versucht die Phthalimid-Schutzgruppe nachträglich mit MeNH_2 bzw. einer 2%-igen Hydrazinlösung abzuspalten. Da eine nachträgliche Abspaltung nicht erfolgreich war, vermutlich wegen der schlechten Reaktivität der einseitig geöffneten Nebenprodukte, wurden einige Methoden zur Entschützung und Abspaltung mit unregierten Substanzen erprobt.

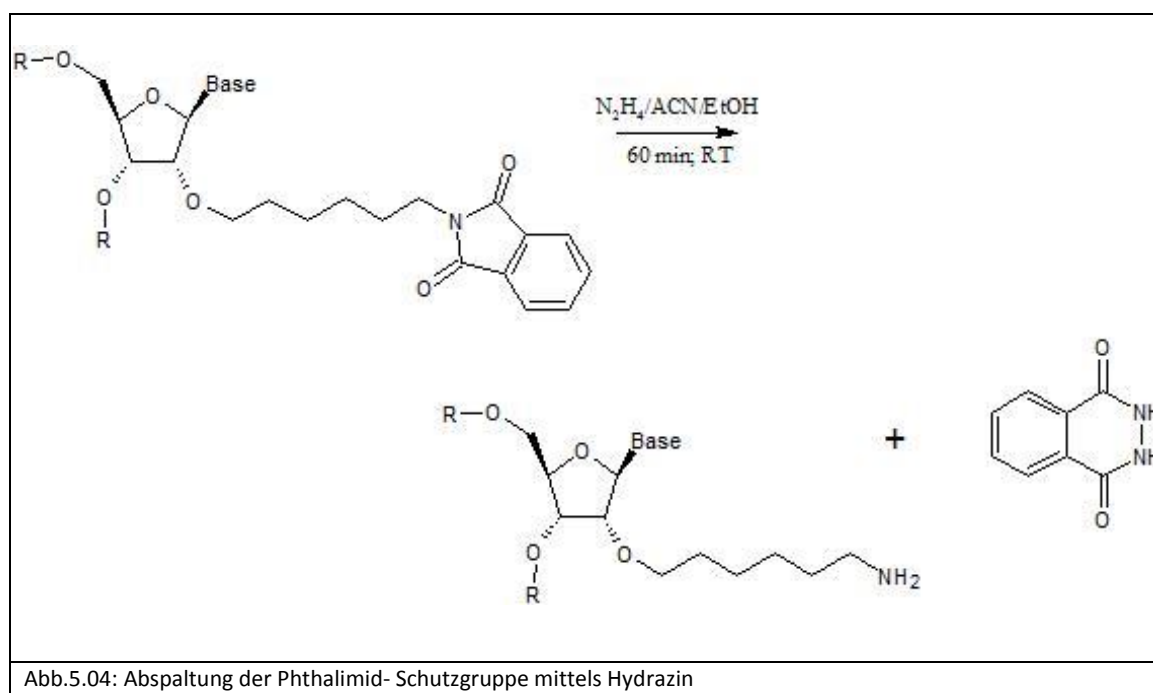
Dabei wurden kleine Mengen des beladenen Harzes entnommen und auf unterschiedlichste Weise behandelt.

Während der Versuche stellte sich heraus, dass die Menge des zu entschützenden Oligonukleotids (=Menge des Harzes), die Konzentration der Hydrazinlösung und auch die Dauer der Abspaltung gut aufeinander abgestimmt sein mussten. So führten größere Mengen an Harz und kürzere Entschützungszeiten zu teilweise unentschützten

Produkten, während eine zu große Konzentration an Hydrazinhydrat und eine länger andauernde Entschützung zu sehr geringen Ausbeuten (1-2 nmol) führten, was möglicherweise auf eine Zersetzung der Oligonukleotide zurückzuführen ist. Eine Übersicht bietet Tabelle 5.01.

Menge an Harz	Hydrazin-Behandlung	AMA-Behandlung	Ergebnis
0,5 mg	-----	1 ml; 65°C; 60 min	nicht vollständig entschützt
1 mg	500 µl einer 2%-igen Lösung; 60 min; RT	1 ml; 65°C; 60 min	nicht vollständig entschützt
1 mg	500 µl einer 2%-igen Lösung; 12 h; RT	1 ml; 65°C; 60 min	Zersetzung
1 mg	30 µl Hydrazinhydrat; 60 min; RT	1 ml; 65°C; 60 min	Zersetzung
0,5 mg	500 µl einer 2%-igen Lösung; 60 min; RT	1 ml; 65°C; 60 min	erfolgreich (Ausbeute: ca. 3 nmol)
1 mg	1 ml einer 2%-igen Lösung; 120 min; RT	1 ml; 65°C; 60 min	erfolgreich (Ausbeute: ca. 8 nmol)
Tab.5.01: Übersicht über getestete Methoden zur Entschützung der SSO			

Obwohl sich die Abspaltung der Phthalimid-Schutzgruppe als schwierig erwies, wurde zuletzt durch Erprobung verschiedener Methoden eine geeignete Methode gefunden (Punkt 3.2). In einer zweistufigen Reaktion wurde zunächst die Phthalimid-Schutzgruppe mittels Hydrazin-Lösung abgespalten (Abb.5.04). Anschließend erfolgten die Abspaltung vom Harz und die restliche Entschützung wie üblich mittels AMA.



Die Überprüfung der Abspaltung und Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte mittels PAGE und HPLC. Am Gel war eine Hauptbande zu sehen. Auch Banden von Fehlsequenzen waren zu erkennen, die aber durch die Synthese am Synthesizer normal sind. Bei der Analyse mittels HPLC war jeweils nur ein Peak zu erkennen, was für eine erfolgreiche Entschützung und Aufreinigung spricht. Die massenspektrometrischen Analysen beweisen, dass die Oligonukleotide erfolgreich entschützt und aufgereinigt wurden.

5.3. PEG- Konjugate

Die PEGylierung der Oligonukleotide sollte über die 2'- bzw. 3'-Aminohexyl-Linker stattfinden. Während die Linker in 2'-Position über den modifizierten Adenosin-Baustein eingefügt wurden, konnten die Linker in 3'-Position über ein modifiziertes Harz am 3'-Ende der Oligonukleotide eingefügt werden.

Die Reaktion der NHS-aktivierten PEG-Ketten mit den Aminohexyl-Linker wurde bei einem pH 7-9 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen können die primären Amine der Aminohexyl-Linker gut mit dem NHS-Ester reagieren und stabile Amide bilden. Dabei war ein hoher Überschuss an NHS-PEG notwendig.

Bei der Gelelektrophorese wanderten die PEGylierten Oligonukleotide etwas langsamer, was auf ihr höheres Molekulargewicht zurückzuführen ist. Auch bei der Analyse mittels HPLC war ein Unterschied in der Retentionszeit zu sehen. Die Konjugate waren polarer und wurden deshalb länger zurückgehalten, als die ungekoppelten Oligonukleotide.

Die Analyse mittels ESI-MS bestätigte die erfolgreiche PEGylierung in guten, praktisch quantitativen Ausbeuten.

5.4. Konklusion:

Durch die PEGylierung von Oligonukleotiden ist es für gewöhnlich möglich, deren Eigenschaften zu verbessern. Konjugate zeigen meist eine verbesserte Stabilität gegenüber Nukleasen, eine verlängerte Halbwertszeit, eine geringere Toxizität und weniger immunologische Effekte. Eine PEGylierung kann aber auch zu negativen Effekten, wie einer verminderten Zellaufnahme der hydrophilen Konjugate, führen. Lange PEG-Ketten stellen außerdem eine sterische Hinderung dar und können die Bindungseffizienz negativ beeinflussen.

Ob auch die hergestellten Oligonukleotid-Konjugate diese Eigenschaften aufweisen ist noch ungewiss. Jedoch war die Herstellung mehrfach 2'-PEGylierter Oligonukleotide erfolgreich. Die Synthese des geeigneten Phosphoramidit-Bausteins erfolgte plangemäß und stellte keine Probleme dar. Auch die Synthese mittels Festphasensynthesizer war erfolgreich.

Die Abspaltung und Entschützung der Oligonukleotide gestaltete sich aufwändiger als geplant, da die Entschützung der Phthalimid-Schutzgruppe einen separaten Reaktionsschritt mit Hydrazinhydrat erforderte. Obwohl die Entschützung letztendlich gelang, wäre es dennoch eine Überlegung wert, bei der Synthese des 2'-modifizierten Nukleotids eine andere Schutzgruppe, die unter basischer Hydrolyse entfernt werden kann, für die Aminogruppe des Linkers einzusetzen.

Die PEGylierung der entschützten Oligonukleotide wiederum war gut durchführbar und zeigte auch gute Ergebnisse.

Ob und welche Auswirkungen die PEGylierung in 2'-Position auf die biologische Aktivität der Oligonukleotide hat, muss noch mittels Zellkulturtests eruiert werden.

6. Abkürzungen

AA	Ammoniumacetat
ACN	Acetonitril
AMA	Methylamin/Ammoniumhydroxid; 1:1
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
APS	Ammoniumpersulfat
Ar	Aromat
BzCl	Benzoylchlorid
Bz	Benzoyl
CPG	Controlled Pore Glass
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dsRNA	doppelsträngige RNA
ESI-MS	Elektronensprayionisation-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
HMW	High Molecular Weight
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LMW	Low Molecular Weight
LNA	locked nucleic acid
MeOH	Methanol
miRNA	micro-RNA
mRNA	messenger RNA; Boten-RNA
MTBE	Methyl-tert-butylether
NaCl ges.	Natriumchlorid, gesättigt
NaHCO ₃ ges.	Natriumhydrogencarbonat, gesättigt
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NHS	N-Hydroxysuccinimid

NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernspinresonanz
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
Ph	Phenyl
Pht	Phthalimid
PNA	peptide nucleic acid, Peptid-Nukleinsäure
PBS	Phosphate Buffered Saline; salzhaltiger Phosphatpuffer
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure (RNS)
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SG	Schutzgruppe
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
SSO	splice switching Oligonukleotid
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEA.3HF	Triethylamin trihydrofluorid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TMS-Cl	Chlortrimethylsilan

7. Referenzen

- 1 Singh, Y., Murat, P., & Defrancq, E. (2010). Recent developments in oligonucleotide conjugation. *Chemical Society Reviews*, 39(6), 2054-2070.
- 2 Crooke, S. T. (2013). RNA directed therapeutics: mechanisms and status. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*.
- 3 Kher, G., Trehan, S., & Misra, A. (2010). Antisense oligonucleotides and rna interference. *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*, 325.
- 4 Bennett, C. F., & Swayze, E. E. (2010). RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, 259-293.
- 5 Juliano, R. L., Ming, X., & Nakagawa, O. (2012). The chemistry and biology of oligonucleotide conjugates. *Accounts of chemical research*, 45(7), 1067-1076.
- 6 Bauman, J., Jearawiriyapaisarn, N., & Kole, R. (2009). Therapeutic potential of splice-switching oligonucleotides. *Oligonucleotides*, 19(1), 1-13.
- 7 Urban, E., & Noe, C. R. (2003). Structural modifications of antisense oligonucleotides. *Il Farmaco*, 58(3), 243-258.
- 8 Winkler, J. (2011). Nanomedicines based on recombinant fusion proteins for targeting therapeutic siRNA oligonucleotides. *Therapeutic delivery*, 2(7), 891-905.
- 9 Ikeda, Y., & Nagasaki, Y. (2013). Impacts of PEGylation on the gene and oligonucleotide delivery system. *Journal of Applied Polymer Science*.
- 10 Li, W., Zhan, P., De Clercq, E., Lou, H., & Liu, X. (2013). Current drug research on PEGylation with small molecular agents. *Progress in Polymer Science*, 38(3), 421-444.
- 11 Govan, J. M., McIver, A. L., & Deiters, A. (2011). Stabilization and photochemical regulation of antisense agents through PEGylation. *Bioconjugate chemistry*, 22(10), 2136-2142.

- 12 Alam, M. R., Ming, X., Nakagawa, O., Jin, J., & Juliano, R. L. (2013). Covalent conjugation of oligonucleotides with cell-targeting ligands. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(20), 6217-6223.
- 13 Lönnberg, H. (2009). Solid-phase synthesis of oligonucleotide conjugates useful for delivery and targeting of potential nucleic acid therapeutics. *Bioconjugate chemistry*, 20(6), 1065-1094.
- 14 Winckler, T. (2014). Fine-Tuning der Blutgerinnung. *PHARMAKON*, 2(2), 84-89.
- 15 Winkler, J., Giessrigl, B., Novak, C., Urban, E., & Noe, C. R. (2010). 2'-O-Lysylaminohexyladenosine modified oligonucleotides. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 141(7), 809-815.
- 16 Burnett, J. C., & Rossi, J. J. (2012). RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chemistry & biology*, 19(1), 60-71.
- 17 Shi, F., & Hoekstra, D. (2004). Effective intracellular delivery of oligonucleotides in order to make sense of antisense. *Journal of controlled release*, 97(2), 189-209.
- 18 Fattal, E., & Bochot, A. (2008). State of the art and perspectives for the delivery of antisense oligonucleotides and siRNA by polymeric nanocarriers. *International journal of pharmaceutics*, 364(2), 237-248.
- 19 De Martimprey, H., Vauthier, C., Malvy, C., & Couvreur, P. (2009). Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: oligonucleotides and siRNA. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 71(3), 490-504.
- 20 Pérez, B., Vilageliu, L., Grinberg, D., & Desviat, L. R. (2014). Antisense Mediated Splicing Modulation For Inherited Metabolic Diseases: Challenges for Delivery. *Nucleic acid therapeutics*, 24(1), 48-56.
- 21 Aartsma-Rus, A. (2010). Antisense-mediated modulation of splicing. *RNA biology*, 7(4), 453-461.
- 22 Veronese, F. M., & Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug discovery today*, 10(21), 1451-1458.

- 23 Zlatev, I., Manoharan, M., Vasseur, J. J., & Morvan, F. (2012). Solid-Phase Chemical Synthesis of 5'-Triphosphate DNA, RNA, and Chemically Modified Oligonucleotides. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 1-28
- 24 Bauman, J. A., & Kole, R. (2011). Modulation of RNA splicing as a potential treatment for cancer. *Bioengineered bugs*, 2(3), 125-128.
- 25 Aagaard, L., & Rossi, J. J. (2007). RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Advanced drug delivery reviews*, 59(2), 75-86.
- 26 Ozpolat, B., Sood, A. K., & Lopez-Berestein, G. (2010). Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *Journal of internal medicine*, 267(1), 44-53.
- 27 Peer, D., & Lieberman, J. (2011). Special delivery: targeted therapy with small RNAs. *Gene therapy*, 18(12), 1127-1133.
- 28 Roberts, M. J., Bentley, M. D., & Harris, J. M. (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced drug delivery reviews*, 54(4), 459-476.
- 29 Bestas, B., McClorey, G., Tedebark, U., Moreno, P. M., Roberts, T. C., Hammond, S. M., ... & Andaloussi, S. E. (2014). Design and Application of Bispecific Splice-Switching Oligonucleotides. *Nucleic acid therapeutics*, 24(1), 13-24.
- 30 Spraggon, L., & Cartegni, L. (2013). Antisense modulation of RNA processing as a therapeutic approach in cancer therapy. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*.
- 31 Aartsma-Rus, A. (2010). Antisense-mediated modulation of splicing. *RNA biology*, 7(4), 453-461.
- 32 Veronese, F. M., & Morpurgo, M. (1999). Bioconjugation in pharmaceutical chemistry. *Il Farmaco*, 54(8), 497-516.
- 33 Pasut, G., & Veronese, F. M. (2007). Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies. *Progress in Polymer Science*, 32(8), 933-961.
- 34 Harris, J. M., & Chess, R. B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(3), 214-221.

- 35 Pasut, G., & Veronese, F. M. (2012). State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 461-472.

Lebenslauf

Barbara Pöhacker

barbara.poehacker@gmail.com

Ausbildung

09/2000-06/2008 Stiftsgymnasium in Melk (Humanistischer Zweig)

10/2008-06/2014 Universität Wien, Fakultät für Pharmazie

Berufserfahrung

08/2008 und 08/2009 Ferialpraktikum bei der NÖGKK in St.Pölten

07/2010 Ferialpraktikum bei der Apotheke Zur Heimat in Loosdorf

07/2011 Ferialpraktikum bei der Apotheke Zum hl. Geist in Ybbs

09/2011 Ferialpraktikum bei der Landschaftsapotheke in Melk

05/2012-04/2014 geringfügig Angestellte bei der Internationalen Apotheke in Wien

Fremdsprachenkenntnisse

Englisch

Spanisch: Anfängerkurs an der Wirtschaftsuniversität Wien (03/2012-06/2012)