



DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

"Synthese von Peptid-Oligonukleotid-Konjugate über
eine 2'-Disulfidbrücke eines modifizierten Uridin-
bausteins"

verfasst von / submitted by

Sabine Kalchgruber

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015 / Vienna, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Mag. Dr. Johannes Winkler, Priv.-Doz.

Mitbetreut von / Co-Supervisor:

Dr. Mehrdad Dirin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch Unterstützung und Motivation ihren Teil zu meiner Diplomarbeit beigetragen haben.

Ganz besonderen Dank gilt Herrn PD Dr. Johannes Winkler, der es mir ermöglicht hat meine Diplomarbeit, am Department für pharmazeutische Chemie, zu absolvieren.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Mehrdad Dirin für die Betreuung während der praktischen Arbeit und die Unterstützung beim Auswerten der NMR-Spektren.

Außerdem möchte ich meinen Studienkollegen, allen voran Herrn Felix Panis, für ihre Hilfsbereitschaft und Motivation danken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Lebenspartner, ohne deren Unterstützung ich dieses Studium nie hätte absolvieren können. Zusätzlich möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinem Schwager, Herrn Benjamin Heinzle, für das Korrekturlesen bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	2
Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung.....	5
Abstract.....	7
1. Einleitung.....	8
1.1. Antisense Oligonukleotide und deren Einsatz in Medizin und Forschung ...	8
1.2. Modifikationen.....	10
1.2.1 Veränderungen am Grundgerüst.....	10
1.2.2. Chemische Konjugationen.....	13
1.2.3. Peptid-Oligonukleotid-Konjugate	14
1.3. Mechanismen der Interaktionen.....	15
1.3.1. Internalisierung.....	15
1.3.2. Down Regulation der Genexpression.....	18
1.4. Barrieren, Limitationen und Toxizität	20
2. Ziel.....	22
3. Materialien und Methoden	23
3.1. Synthese von 2,2'-Anhydro-1-(β -D-arabinofuranosyl)uracil	24
3.2. Synthese von 2'-modifiziertem Anhydrouridin.....	25
3.2.1. Herstellung der Alkylseitenkette.....	25
3.2.2. Kopplung der Seitenkette.....	26
3.2.3 Verknüpfung der DMTr-Schutzgruppe und des Linkers	27
3.3. Harzkopplung.....	30
3.4. Oligonukleotidsynthese, Entschützung und Aufreinigung	31
3.4.1. Synthese am Synthesizer	31
3.4.2. Abspaltung und Entschützung	32
3.5. Peptid-Konjugate	33
3.6. Analytik der Oligonukleotide und deren Konjugate.....	33

3.6.1. Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	33
4. Resultate und Diskussion.....	35
4.1. Synthese von 2'-modifiziertem Anhydrouridin mit entsprechenden Schutzgruppen.....	35
4.2. Oligonukleotidsynthese, Entschützung und Aufreinigung	39
4.2.1.Synthese am Synthesizer.....	39
4.2.2. Abspaltung und Entschützung	40
4.3. Peptid-Konjugate	40
4.4. Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	41
5. Zusammenfassung.....	43
6. Abkürzungen	44
7. Referenzen.....	46
Curriculum vitae	49

Zusammenfassung

Die Tatsache, dass kurze RNA und DNA Oligonukleotide mit einer Ziel-RNA interagieren und somit selektiv auf die Genexpression wirken können, ist heute anerkannter wissenschaftlicher Konsens. Aus diesem Grund sind Antisense Oligonukleotide, mit deren zur mRNA komplementären Basensequenz, in den Fokus der Arzneimittelforschung gerückt. Im Gegensatz zu klassischen Therapeutika, welche überwiegend die Funktion von Proteinen hemmen, sind diese in der Lage die Biosynthese von Proteinen zu verhindern und somit selektiv die Proteinherstellung zu blockieren. Damit wurde ein neuer Ansatz für die Erforschung und Entwicklung entsprechender Therapeutika geschaffen. Besonders interessant ist der Einsatz von Antisense Wirkstoffen bei genetischen und viralen Erkrankungen als auch in der Krebstherapie. Der große Erfolg blieb bis dato aber aus, da Punkte wie der Abbau durch Enzyme, der Transport zu den Zielzellen, die Halbwertszeit und die, mit der unspezifischen Bindung einhergehenden, Nebenwirkungen noch ein großes Problem darstellen. All diese Probleme sollen durch die Entwicklung einer neuen Generation von AONs verringert werden. So können durch verschiedene Modifikationen und Konjugate die Eigenschaften der Therapeutika verbessert werden. Beispielsweise führt die Konjugation mit Peptiden zu einer gesteigerten Zellaufnahme und kann die Spezifität für die Zielzellen erhöhen.

Das Ziel dieser Diplomarbeit war die Synthese einer solchen Peptidkonjugation. Die Besonderheit dieser liegt in den verbesserten Eigenschaften hinsichtlich Spezifität und Zellaufnahme, wobei die Auswahl des Linkers von entscheidender Bedeutung war. So kann durch die Verwendung eines stabilen, geschützten Thiols als Linker das Peptid über eine Disulfidbrücke gekoppelt werden. Die labile Disulfidverknüpfung soll eine anschließende Spaltung im Endosom ermöglichen.

Dazu erfolgte die Synthese des modifizierten Nukleotidbausteins. Eine 2'-Thiolmodifikation des Uridins ermöglichte später eine kovalente Bindung der Peptide. Die Überprüfung der Reaktions- und Aufreinigungsschritte erfolgte mittels DC, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ und Gelelektrophorese.

Der entsprechende Baustein wurde anschließend mit Standard-Festphasensynthese in ein Oligonukleotid eingebaut.

Nach der Abspaltung, Entschützung und Aufreinigung der Oligonukleotide wurden basische, zellpenetrierende Peptide an die modifizierten Oligonukleotide gekoppelt. Die Synthese des Nukleotids und auch die Herstellung der Peptidkonjugate konnte erfolgreich nachgewiesen werden.

Abstract

Today it is commonly known that short RNA and DNA oligonucleotides are able to interact with a target-RNA. In this way they can affect selectively gene expression. For this reason antisense oligonucleotides, with their base sequence complementary to the mRNA, have been in the focus of drug research for quite some time. In contrast to conventional pharmaceuticals which inhibit predominantly the activity of proteins, antisense oligonucleotides stop the biosynthesis of proteins and thus the selective protein production. For this reason, a new approach was developed for the investigation and development of matching therapeutics. Especially interesting is their use for genetic and viral diseases and their usage for cancer therapies. But the limited use of the previous synthesized oligonucleotides prevented a big breakthrough so far. The side effects caused by the unspecific bond and the reduction caused by enzymes, together with inefficient transport to the target cells plus a short half-life period, constitute specific problems. The development of a new generation of oligonucleotides try to reduce this problems. Through different modifications and conjugations they will enhance the characteristics of this therapeutics. The conjugation with peptides, for example, causes an increased cell intake. Moreover the specificity for the target cells will increase.

The aim of this diploma thesis was the synthesis of such peptide conjugates. The exceptionality of this compound is the improved characteristics regarding the cell uptake and the cell specificity. The selection of the linker is essential. The peptide can be linked through a disulfide bond, using with a stable and protected thiol as linker precursor. Afterwards the splitting takes place in the cell without any problems.

First the modified nucleotide building block was synthesized. The 2'-modified uridine enabled the generation of a covalent bond with the peptides. The validation of the reaction and the purification was done by DC, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and gel electrophoresis. Afterwards the synthesized building block was incorporated in an oligonucleotide through solid-phase synthesis.

After deprotection and purification of the oligonucleotides, cationic cell penetrating peptides were linked with the modified oligonucleotides.

In conclusion, procedures for syntheses of the nucleotide, the oligonucleotides and conjugations with the peptides were successfully established.

1. Einleitung

1.1. Antisense Oligonukleotide und deren Einsatz in Medizin und Forschung

Seit den Erforschungen und Studien von Paterson et al. (1977) ist bekannt, dass die Genexpression durch exogenen Nukleinsäuren beeinflusst werden kann.¹ 1978 zeigten dann Zamecnik und Stephenson im Zellversuch die Inhibierung des Rous Sarkoma Virus durch synthetische Oligonukleotide.² Wenig später veröffentlichte Whitesell die erste Studie über die in vivo Aktivität von Oligonukleotiden in einer neuroepithelialen Mauszelllinie. In dieser Studie wurde der Verlust von N-MYC Protein, eine Änderung in der Zellmorphologie und ein Rückgang der Tumormasse aufgezeigt.³

Diese Erkenntnisse sowie das heutige Wissen um die Sequenzierung des menschlichen Genoms machen Oligonukleotide für Medizin und Forschung nutzbar. So werden heute im Labor hergestellte, modifizierte Oligonukleotide, sogenannte AONs (Antisense Oligonukleotide) eingesetzt. Ihre relativ geringen Herstellungskosten und ihr einfaches analytisches Design qualifizieren sie für den Einsatz in Gentherapie und-forschung.⁴

Als Therapeutika werden sie vorwiegend für die Behandlung von viralen Infektionen, Krebs und entzündlichen Erkrankungen untersucht. Dabei blockieren AONs als antivirale Wirkstoffe Targets wie DNA Polymerasen, Proteine und Enzyme auf translationaler Ebene. Des Weiteren bieten sie in der Krebstherapie eine gute Alternative zu zytotoxischen Wirkstoffen, da ihre Spezifität für das Target und damit verbunden ihre reduzierte Toxizität einen Vorteil darstellen. Targets für die Krebstherapie sind u.a. Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Onkogene und Zytokine.⁵

Ein Antisense Oligonukleotid besteht aus einem, zur Target mRNA komplementären, Desoxyribonukleotid-Analoga in Form eines kurzen Einzelstrangs, wodurch es befähigt ist die Proteinbiosynthese zu blockieren.⁶

Bei der Biosynthese produziert jedes Gen in der Phase der Transkription eine große Anzahl von Kopien der mRNA, welche wiederum in eine große Anzahl an Proteinmolekülen translatiert werden.

Dies ist der Grund warum die Inhibierung der Genexpression durch AONs effizienter ist als die Inhibierung der resultierenden Proteine.⁷ Die Hybridisierung via Watson Crick Basenpaarung kann eine spezifische Inhibierung der Genexpression, durch unterschiedliche Mechanismen, bewirken.⁶

Dennoch gilt es zu erwähnen, dass bislang kaum klinische Erfolge beim Einsatz von AONs zu verzeichnen waren. Als Hauptgründe für diese Negativbilanz lassen sich Instabilität gegenüber Nukleasen, ungenügende Spezifität, geringe Aufnahme und schlechte Zugänglichkeit des Target nennen.⁸

Aufzuzeigen wäre noch, dass in der Gentherapie Nukleinsäuren bzw. Oligonukleotide verwendet werden, um neue Gene einzuführen, in der Antisense-therapie hingegen verwendet man diese, um existierende Gene zu kontrollieren.⁹

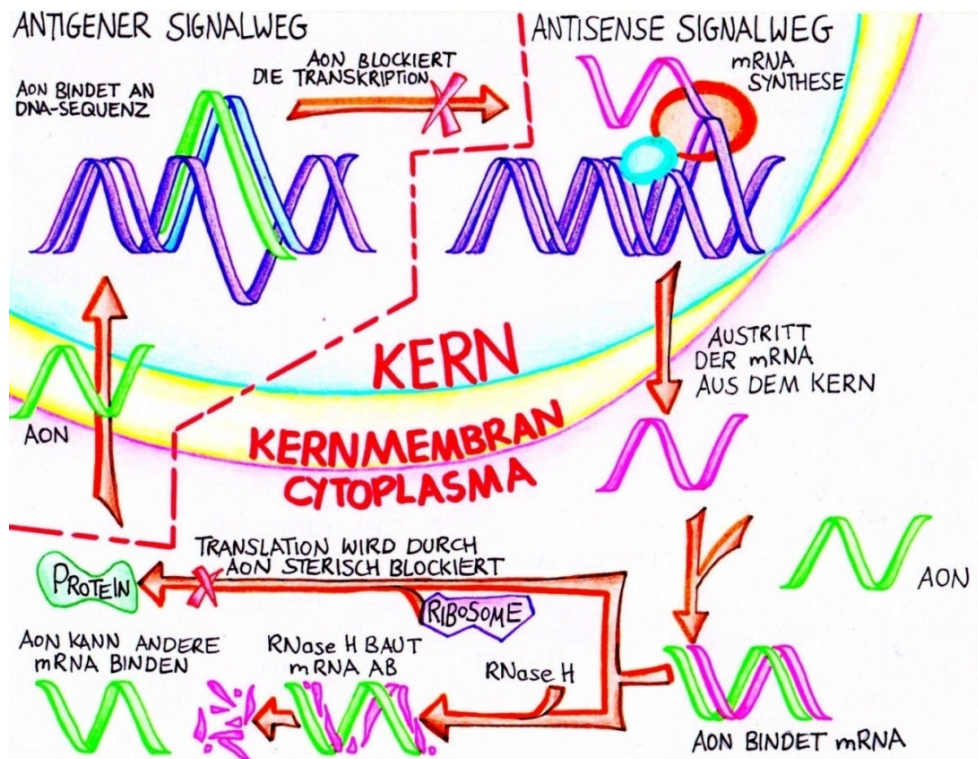


Abb. 1.01: Wirkmechanismen von Antigenen und Antisense Therapeutika.

1.2. Modifikationen

Antisense Oligonukleotide sind instabil gegenüber Nukleasen und können aufgrund ihrer negativen Ladung die Zellmembran nicht durchdringen. Um ihre Stabilität zu erhöhen, die Gewebelbaltzeit zu verlängern, die Affinität und Wirkstärke zu steigern und die nichtsequenzspezifische Toxizität zu verringern wurden spezielle Modifikationen entwickelt.⁶

1.2.1 Veränderungen am Grundgerüst

Die ersten synthetisierten, modifizierten Oligonukleotide waren Methylphosphonate. Um ein solches zu synthetisieren wird ein Sauerstoffatom durch eine Methylgruppe substituiert, was die Löslichkeit reduziert und so die Stabilität in biologischen Systemen erhöht.^{4,10} Allerdings verursachen Methylphosphonate eine Helix-Destabilisierung und können die RNase H nicht aktivieren. Dies erschwert deren Einsatz als Antisense Effektormoleküle.⁴

Auch Phosphorthioate gehören zur ersten Generation modifizierter Oligonukleotide. Zur Herstellung dieser wird ein Sauerstoffatom gegen ein Schwefelatom ausgetauscht.¹¹ Phosphorthioate sind gegenüber Nukleasen stabil, in biologischen Systemen schwer löslich und besitzen eine hervorragende Antisense Aktivität. Außerdem sind sie fähig die RNase H zu aktivieren. Allerdings weisen sie eine hohe Affinität zu verschiedenen Serum- und Zellproteinen auf, was deren Einsatz einerseits beschränkt, sie andererseits jedoch vor der glomerulären Filtration und damit vor der Ausscheidung über den Urin schützt.^{4,10}

Phosphoramidate und Thiophosphoramidate stellen weitere Vertreter modifizierter Oligonukleotide dar. Bei der Synthese von Phosphoramidaten wird der Sauerstoff in 3'-Position des Desoxyribose-Rings mit einer Aminogruppe substituiert. Diese Verbindungen zeigen eine erhöhte Affinität zu komplementärer RNA und hohe Nukleaseresistenz, jedoch können sie die RNase H nicht aktivieren. Thiophosphoramidate hingegen sind erhöht säurestabil. Der Austausch des Sauerstoffes gegen den Schwefel ändert in diesem Fall aber die RNA Bindungseigenschaften nicht.¹⁰

Zuckermodifikationen

Modifikationen dieser Art werden der zweiten und dritten Generation von AONs zugeordnet.¹²

Als bedeutendste Vertreter der zweiten Generation sind 2'-substituierte O-Alkyl- und 2'-O-Methoxyethyl-Nukleinsäuren anzuführen. Erstgenannte Modifikation induziert den Antisense Effekt durch einen RNase H unabhängigen Mechanismus. Sie sind in der Lage die Entfernung von Introns zu verhindern und die mRNA Translation effektiv zu inhibieren.⁴

Die Besonderheit von 2'-O-Methoxyethylmodifikationen besteht darin, gewisse nicht-spezifische Proteinbindungen zu erschweren und dadurch die Toxizität zu reduzieren. Ihre gesteigerte Nukleaseresistenz ist wahrscheinlich auf die sterische Hinderung, durch die Substituenten in Kombination mit der Ausbildung einer Hydrathülle, zurückzuführen.¹⁰

Die dritte Generation modifizierter Oligonukleotide beschreibt verschiedene Formen, welche die Biostabilität und die Zellaufnahme verbessern. Hierzu gehören unter anderem die Phosphoramidat-Morpholino-Oligomere (PMOs), welche anstatt des Furanoserings ein Morpholinring besitzen.^{10,12} Sie sind in biologischen Systemen stabil und besitzen effiziente Antisense Aktivität in zellfreien- und in einigen Tierzellsystemen. Da sie aber nicht geladen sind, haben sie weniger spezifische Eigenschaften als Phosphorthioate. Dieses Problem lässt sich durch die sogenannte "scrape-loading" Technik lösen.⁴ Bei dieser Methode werden die Zellen sanft "angekratzt". Dadurch werden Übergänge in der Plasmamembran erzeugt, durch die die Oligonukleotide passieren können.¹³ Der Übergang ins Cytoplasma wird erleichtert und der antisense Effekt maximiert. Jedoch sind PMOs keine Substrate für die RNase H und bilden keine Komplexe mit kationischen Lipiden.⁴

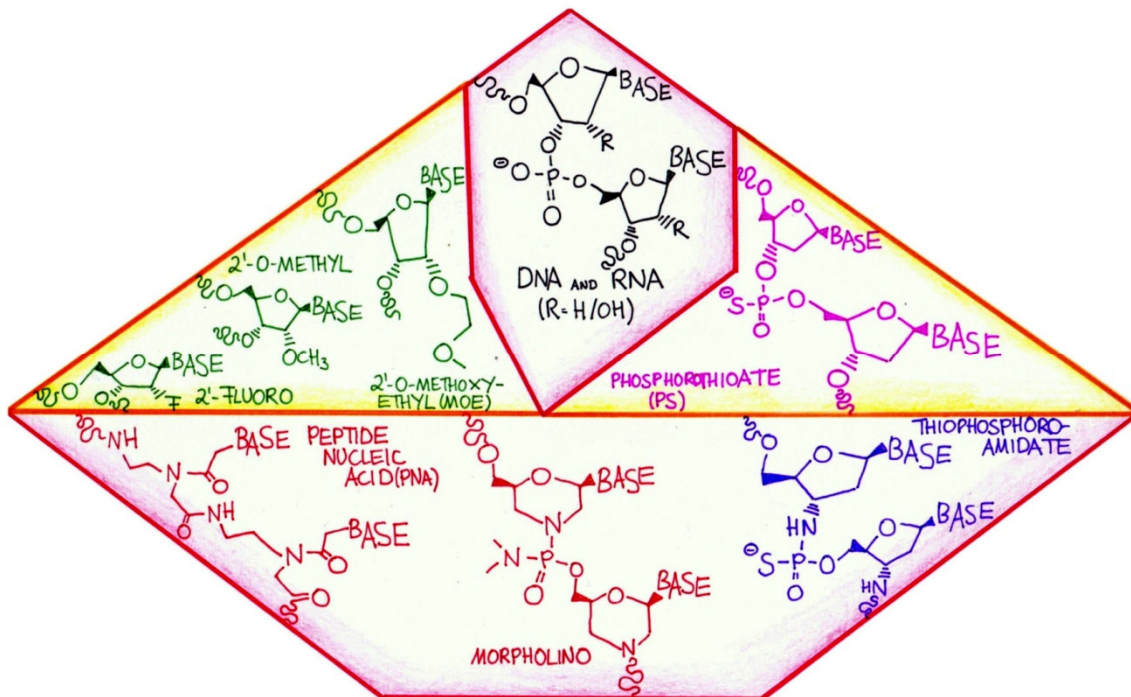


Abb. 1.02: Verschiedene Beispiele von Modifikationen an Oligonukleotiden.

Heterocyclische Modifikationen

Diese Modifikationen führen zu einer gesteigerten Interaktion oder zu einer stärkeren Watson-Crick Basenpaarung. Die 5'-Position am Pyrimidin Heterozyklus bietet sich für Veränderungen an. Die Substitution an dieser Position steigert die Affinität ohne die Fähigkeit, als RNase H Substrat zu wirken, zu verändern.

Durch den Austausch des Wasserstoffes in 5'-Position des Desoxycytidin mit einer Methylgruppe wird der Schmelzpunkt des DNA-RNA Duplex aufgrund von verbessertem "base stacking", um 0.5°C gesteigert.¹⁰

Peptid-Nukleinsäuren

Peptid-Nukleinsäuren unterscheiden sich von jeder anderen Klasse von AONs durch den Austausch des Zuckerphosphatgrundgerüsts durch ein Peptid. Die Fähigkeit zur Watson-Crick Basenpaarung bleibt dennoch erhalten.

Sie sind resistent gegen Nukleasen und Proteasen und zeigen eine hohe Affinität zu RNA und DNA.

Peptid-Nukleinsäuren sind jedoch keine Substrate der RNase H und können, obwohl sie nicht geladen sind, die Zellmembran nur schwer durchdringen. Um ein Durchdringen der Zellmembran dennoch zu ermöglichen, können sie entweder mit kurzen Signalpeptiden konjugiert werden oder durch Einbringen von basischen Aminosäuren im Rückgrat die negative Ladung entfernt werden. Außerdem lässt sich durch die Verwendung von geladenen Aminosäuren im Grundgerüst ihre Löslichkeit steigern. Die kurzen Signaleptide sind auch in der Lage die Gewebeverteilung zu sichern. Ursprünglich wurden 8-mer Lysin konjugierte Peptid-Nukleinsäuren entwickelt, um das Spleißen zu modulieren und die Expression des Targetproteins zu reduzieren. Studien mit Peptid-Nukleinsäuren zeigen erhöhte Zellaktivität, mit einer Erhöhung der Spleißprodukte und damit einhergehender Dosis abhängiger down-Regulation von Targetproteinen im Fettgewebe. In Leber und Niere wird hingegen nur sehr geringe Aktivität festgestellt.¹⁰

1.2.2. Chemische Konjugationen

Bei der chemischen Konjugation werden unterschiedliche Liganden am Oligonukleotid angebunden, wodurch dessen Eigenschaften in verschiedenster Hinsicht verbessert werden können. Es gibt unterschiedliche Bindungsstellen für Liganden, welche Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften haben. Bevorzugt werden, wegen der relativ einfachen Kopplungsmöglichkeiten, die 3'- bzw. 5'-Position des Oligonukleotids mit Liganden verbunden.¹⁴

Die einfachste Form der chemischen Konjugation ist die PEGylierung von Oligonukleotiden, welche zu einem erhöhten Molekulargewicht und damit zu gesteigerter Plasmahalbwertszeit führt. Polyethylenglykol (PEG) ist ein Polymer, welches mit unterschiedlicher Kettenlänge eingesetzt wird.¹⁵

Zur Verbesserung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften werden bevorzugt Lipid-Konjugate eingesetzt.

Dabei führt vor allem die Konjugation mit Cholesterol zu einer vermehrten Interaktion mit Albumin und Serumlipoproteinen, was zu einer gesteigerten Zellaufnahme von Oligonukleotiden führt.¹⁶

Außerdem zu erwähnen sind Konjugate mit zellpenetrierenden Peptiden. Diese zeichnen sich vor allem durch ihre hohe Stabilität, die erhöhte Zellaufnahme und die starke Bindung an die Targetsequenz aus.⁸

Äußerst vielversprechend, jedoch noch wenig erforscht, sind Antikörper-Konjugate. Antikörper, die in verschiedensten Bereichen der modernen Medizin bereits sehr erfolgreich eingesetzt werden, bieten enormes Potenzial, stellen jedoch Forschung und Entwicklung aufgrund ihrer komplexen Protein Struktur vor eine große Herausforderung.¹⁴

1.2.3. Peptid-Oligonukleotid-Konjugate

Man unterscheidet zwei Arten von Peptiden die für den Transport von Oligonukleotiden eingesetzt werden. Zum einen handelt es sich um kurze, basische Aminosäurehaltige-Peptide, die nicht selbständig in die Zelle eindringen können, jedoch den Transport von molekularen Ladungen über die Plasmamembran erleichtern. Diese Art wird auch als zellpenetrierende Peptide bezeichnet.¹⁷

Zum anderen werden sogenannte Zell-Ziel-Peptide verwendet, welche sehr spezifisch einsetzbar sind und eine starke Affinität zu einer vorgegebenen Zielzelllinie zeigen. Sie interagieren ausschliesslich mit Rezeptoren, die von diesen Zellen überexprimiert werden.¹⁸ Ein Beispiel hierfür wäre die RGD-Sequenz. Diese besteht aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure. Diese Sequenz kann an gewisse Integrine, die als Rezeptor für diese Sequenz fungieren, binden. Integrine sind in der Membran verankert und stellen Transportproteine dar. Das Integrinexpressionsmuster ist für bestimmte Zelltypen unterschiedlich. Auf diese Weise können Oligonukleotide, die mit dieser Sequenz verbunden sind, spezifisch von entsprechenden Zellen aufgenommen werden.¹⁹

Eine Neuheit im Bereich der Peptid-Oligonukleotid Konjugate stellt die Verwendung von chimären Peptiden kombiniert mit diversen Peptidomänen unterschiedlicher Funktionen dar. In einer Studie wurde gezeigt, dass die Koppelung von einem muskelspezifischen Peptid mit einem zellpenetrierenden Peptid in Kombination mit einem Oligonukleotid zusätzlich den in vivo Transport verbessert. Es kam dabei zu einer Korrektur der fehlerhaften Dystrophinproduktion und deshalb zu einer Verbesserung der Symptome der Muskeldystrophie.¹⁷

Des Weiteren zeigen Studien, dass der Einsatz bestimmter Linker den Transport der Peptid-Oligonukleotid Konjugate begünstigt. Solche Linker, zu denen unter anderem gewisse Disulfidverbindungen zählen, sind im Blutkreislauf hinreichend stabil und lassen sich dennoch, sobald das Konjugat die reduzierte Umgebung des Zytoplasmas erreicht hat, problemlos spalten.

Außerdem verringern sie das Risiko von schädlichen Effekten der Peptide bei der Interaktion von Oligonukleotiden mit ihrem Target. Ferner wird durch typische Linker, wie es Thiol- oder Disulfidgruppen sind, die Zellaufnahme verbessert.²⁰

Die Vorteile der Verwendung von Peptiden als Vektoren sind vom jeweiligen Organ und von der Art der Applikation abhängig.¹⁷

1.3. Mechanismen der Interaktionen

Antisense Oligonukleotide müssen an die Target RNA im Inneren des Zytoplasmas binden, um zu wirken. Dazu müssen sie intakt zu spezifischen Zellen, genauer gesagt zu deren Oberfläche vordringen. Über die Plasmamembran erreichen sie das Zytoplasma und von dort gelangen sie zur Target RNA im Zellkern.¹⁰

1.3.1. Internalisierung

Für die down Regulation der Genexpression müssen die Antisense Oligonukleotide in die Zielzellen gelangen. Dies erfolgt für Oligonukleotide ohne zusätzliches Trägersystem durch absorptive Endocytose und Pinocytose. Diese Prozesse beschreiben die Aufnahme von fremden Material in die Zelle. Um die Stabilität der Oligonukleotide auf dem Weg zur Zelle sowie die Zellaufnahme zu steigern, können unterschiedliche Vektoren eingesetzt werden. Dadurch wird eine geringere Konzentration an AONs benötigt. Als ursprüngliche Art von Vektoren gelten Liposomen, also Lipidpartikel, die üblicherweise eine positiv geladene Komponente zur effektiven Komplexierung von Nucleinsäuren sowie zur Interaktion mit negativ geladenen Zellmembranbestandteilen beinhalten.⁴

Des Weiteren können auch kationische Polymere, wie beispielsweise Polyethylenimin, mit der Nukleinsäure durch elektrostatische Wechselwirkungen interagieren und als Komponenten zur Verpackung von Nukleinsäuren eingesetzt werden.²¹

Eine andere Möglichkeit zur Komplexierung stellen Dendrimere dar. Ihre Nanostruktur besteht aus verzweigten Polymeren. Beispielsweise können Lipid-Lysin Dendrimere mit kationischer Oberfläche durch ihre Eigenschaften die Zellmembran leicht durchdringen und Oligonukleotide auf dem Weg zur Zelle vor dem Abbau schützen. Zum einen fungieren diese Lipo-Dendrimere als Lipidlösungsvermittler und zum anderen kann die kationische Oberfläche mit den positiv geladenen Oligonukleotiden eine Ionenpaarbindung eingehen. Dadurch wird die Membranpassage gewährleistet.²²

Alle Materialien (Peptide, Proteine, Dendrimere etc.) können einzeln oder in verschiedenen Kombinationen zur Entwicklung von Nukleinsäure-Formulierungen verwendet werden. So transportierte Oligonukleotide werden in der Regel via Endozytose internalisiert.

Eine weitere Möglichkeit der Internalisierung stellt die Verwendung einfacher Peptide dar. Diese können die Passage über die Plasmamembran durch rezeptor- und transporterabhängige Mechanismen steigern.

Ein weiterer Zugang zur Internalisierung besteht darin eine vorübergehende Membranpermeabilität zu generieren. Dabei werden vorübergehend Poren durch die Membran gebildet. Diese Porenbildung kommt durch Streptolysin-O-Permeabilisierung, mechanisch durch Mikroinjektion, "scrape-loading" oder durch Elektroporation zustande. Dadurch können sogar "naked" Oligonukleotide durch Diffusion in die Zellen gelangen.⁴

Liposomen als Vektoren

Liposomen sind mikroskopische Sphären, die aus ein oder mehreren konzentrischen Phospholipiddoppelschichten bestehen.²³ Die Nukleinsäure kann im Inneren eingeschlossen werden, da ein wässriges Kompartiment vorhanden ist.⁴ Liposomen werden seit 1970 eingesetzt, um die Bioverfügbarkeit von Medikamenten zu erhöhen.²³ Beispielsweise kann das Krebstherapeutikum Doxorubicin (DXR) durch die transmembranäre pH-Gradient Methode in Liposomen eingeschlossen werden. Dabei ist das Innere der Liposomen sauer und der äußere pH-Wert physiologisch.

Das ungeladene DXR wird mit diesen Liposomen inkubiert, wobei es in die Vesikel diffundiert. Es kommt zu einer intravesikulären Protonierung des DXR. Das nun positiv geladene DXR kann die Membrandoppelschicht nicht mehr passieren und ist so eingeschlossen in den Liposomen.²⁴

Liposomen können also Arzneistoffe durch die Umhüllung in Vesikel schützen, die Arzneistoffaufnahme über das Gewebe in das sie sich verteilen steigern, die Dosisintervalle bei steigender Arzneistoffzirkulationszeit vergrößern und die Arzneistoffaufnahme in die Zellen erleichtern. Aufgrund der vielen variablen Parameter lassen sie sich leicht modifizieren. Mögliche Stellgrößen sind Lipidzusammensetzung, Vesikelgröße, Lipidmembranfluidität, Oberflächenladung und Cholesterolanteil. Durch die Modifikation werden die Eigenschaften für den speziellen Gewebetransport verbessert und die Arzneistofftoxizität minimiert.²⁵

Im Falle der Oligonukleotide sind diese entweder mit geladenen Liposomen komplexiert oder in neutralen verkapselt. Die verkapselte Ladung kann zusätzlich von einer Lipidmembran umhüllt sein. Des Weiteren können verschiedene Liganden auf der Oberfläche, unter Verwendung von modifizierten Komponenten der Lipidmembran, verankert sein. Um unspezifische Partikelinteraktionen zu vermeiden wird die PEGylierung angewendet. Soll eine gewisse Spezifität erreicht werden, können andere Liganden für Rezeptor- bzw. Zelloberflächenbindungen wie beispielsweise Hyaluronsäure, Folsäure, Antikörper oder Proteine eingesetzt werden.²⁶

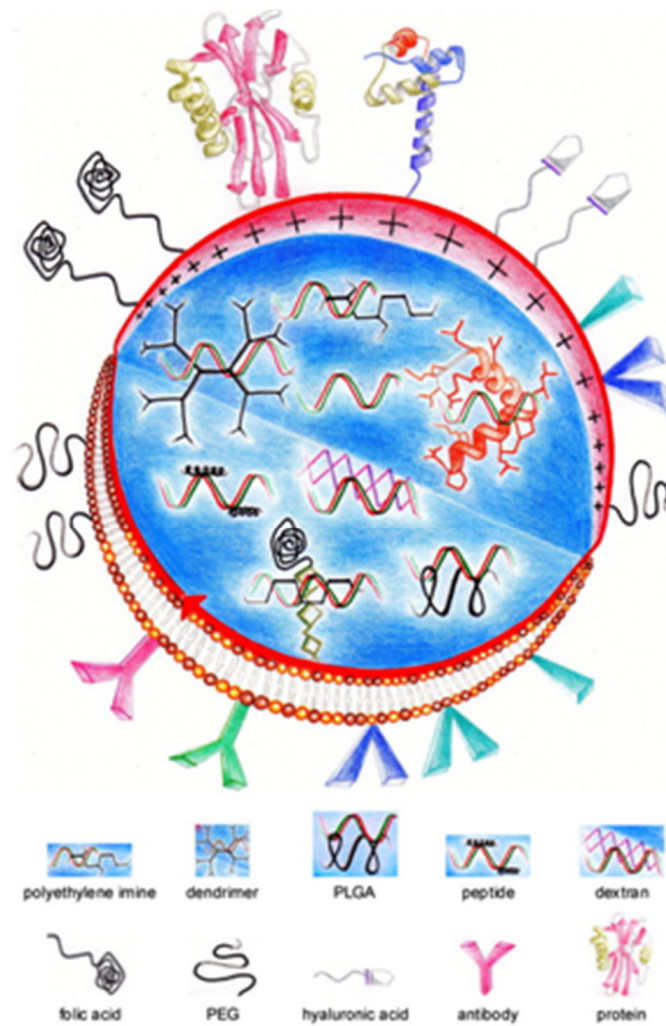


Abb. 1.02²⁶: Schematische Darstellung von Oligonukleotid-Trägersystemen (Liposom, Polymer-Partikel sowie Konjugate) inklusive unterschiedlicher Liganden an der Oberfläche.

1.3.2. Down Regulation der Genexpression

Generell können zwei Mechanismen unterschieden werden.⁴ Einer davon ist der induzierte Protein Knockdown. Dieser wird durch die Induktion der RNase H Endonukleaseaktivität, die den RNA-DNA Heteroduplex aus mRNA und Antisense Oligonukleotid spaltet, erreicht. Infolgedessen kommt es zu einem Abbau der Target mRNA, wodurch die weitere Genexpression verhindert wird.

Der andere Mechanismus bewirkt den Stillstand der Translation durch sterische Hinderung der ribosomalen Aktivität oder durch das Interferieren mit der mRNA. Dabei kommt es zur Inhibierung des Spleißvorgangs und Destabilisierung der prä-mRNA im Kern.⁶

In der Praxis können aber nur einige wenige komplementäre Oligonukleotide erfolgreich zu einer Ziel mRNA hybridisieren. Es wird angenommen, dass größtenteils die schlechte Zugänglichkeit des Targets dafür verantwortlich ist. Der heutige Goldstandard der antisense Wirksamkeit ist die down Regulation der Proteinexpression.⁴

Modulation des Spleißvorganges

Beim Spleißvorgang werden Anteile der mRNA, die sogenannten Introns, die nicht für die Translation benötigt werden, entfernt. Es gibt verschiedene antisense vermittelte Modulationen des Spleißvorgangs, die angewendet werden, um verschiedene genetische Krankheiten zu behandeln.²⁷ Das Spleißen wird von langen, komplexen Ribonukleoproteinen ausgeführt, die als Spleißosom bezeichnet werden. Gene haben verschiedene Introns und viele davon werden in mehr als ein Muster aufgespalten, um eine umfangreiche Anzahl an alternativen mRNA Isoformen zu erhalten.²⁸

Splice-switching Oligonukleotide können nun den Spleißvorgang von Target prä-mRNA blockieren. Der Vorteil dieser Wirkstoffgruppe liegt in der hohen Spezifität und der funktionalen Wiederherstellung von defekten Proteinen bei einigen seltenen Krankheiten. Dem gegenüber stehen die geringe Zellaufnahme, die strukturabhängige Toxizität und die geringe Plasmastabilität.²⁹ Als Splice-switching Oligonukleotide werden RNase inaktive Moleküle, wie etwa vollständig 2'-O-methylierte Sequenzen oder PMOs angewendet.

Eine weitere Form der Modulation ist das Alternative Spleißen von Genen. Dies ist essentiell für die Regulation der Genexpression, da 95% der menschlichen prä-mRNA alternativ aufgespalten werden.^{27,30} Durch diese Art von Spleißen können Stopcodons eingeführt werden, die eine nonsense-vermittelten Zerfall verursachen. Damit wird wiederum die Expression von bestimmten Genen unterdrückt.

Es wurde beispielsweise erfolgreich ein Phosphoramidat-Morpholino-Oligonukleotid entwickelt, welches in Fibroblastenkultur von HGPS Patienten verwendet wird, um die normale Aktivität des Spleißvorganges wiederherzustellen sowie nukleare Abnormalitäten und Fehlanordnungen von anderen nuklearen Hüllproteinen zu korrigieren.²⁷

Weiters können auch Exon-skipping Oligonukleotide verwendet werden, um die Funktion von unerwünschten Genen auszuschalten. Sie bilden mRNA Isoformen, welche für nichtfunktionelle Proteine kodieren oder lösen nonsense-vermittelten Zerfall der mRNA aus.³¹

Verborgene Spleißstellen hingegen sind Sequenzen auf der prä-mRNA, die normalerweise nicht zum Einsatz kommen. Diese werden erst durch eine Mutation aktiviert.³² Es wurde gezeigt, dass durch gezielte Modifikation dieser Stellen mit 2'-O-methylmodifizierten Oligonukleotiden die Spleißosomen blockiert werden.²⁷

1.4. Barrieren, Limitationen und Toxizität

Auf dem Weg zu den Zielzellen müssen AONs diverse biologische Hürden überwinden. Neben zirkulierenden Nukleasen und der Vermeidung einer schnellen renalen Clearance, stellt die Sequestrierung durch das Mononukleäre Phagozytensystem (MPS) eine große Barriere dar. Dieses System ist zusammengesetzt aus Phagozyten, Monozyten und Gewebemakrophagen. Die Funktion dieser ist die Beseitigung fremder Pathogene, nicht funktioneller Zellbestandteile und Apoptose betroffener Zellen. Um zu verhindern, dass auch AONs durch das MPS abgebaut werden, kann man Oligonukleotid-Konjugate verwenden. Sollte es dennoch zur Aufnahme und den Abbau durch das MPS kommen, kann dies neben der Abnahme der Wirksamkeit toxische Folgen, wie beispielsweise eine Milzvergrößerung haben. Auch der Anstieg von Lebertransaminase ist möglich.³³

Das Endothel stellt sowohl eine Barriere als auch eine Möglichkeit für den Einsatz von Oligonukleotiden dar. Seit man herausgefunden hat, dass Endothelzellen eine pathologische Rolle bei diversen Krankheiten spielen, sind sie zunehmend als therapeutisches Target attraktiv. In den meisten Fällen stellt das Endothel aber eine Hürde dar, da die Nukleinsäure dieses passieren müssen, um zum Zielort zu gelangen.³³

Abgesehen von den biologischen Barrieren hängt die häufigste, akut auftretende Toxizität bei der Applikation von Oligonukleotiden in vivo von einer vorübergehende Aktivierung der Komplementärkaskade und einer Inhibierung der Gerinnungskaskade ab. Diese zwei Effekte sind bedingt durch das Oligonukleotid Grundgerüst, nicht aber durch die Oligonukleotidsequenz.⁶

Diese Toxizität hängt größtenteils mit der nichtspezifischen Bindungseigenschaften von diverser Oligonukleotide mit Proteinen bei hohen Plasmakonzentrationen zusammen.³⁴

2. Ziel

Das Ziel meiner Diplomarbeit war die Synthese von 2'-modifizierten Nukleotiden für die Herstellung von Oligonukleotiden am Synthesizer mit anschließender Herstellung stabiler Peptid-Konjugate.

Als wichtiger Schritt zur Generierung von Disulfidkonjugaten von Peptiden und Oligonukleotiden musste zunächst ein stabiler Thiol-Linker mit einer geeigneten Schutzgruppe hergestellt werden. Für die Verwendung in der automatisierten Oligonukleotidsynthese musste danach die Synthese eines entsprechenden Succinyl-Bausteins des 2'-modifizierten Uridins mit den Standard-Schutzgruppen erfolgen. Dazu sollte zuerst DMTrCl als Schutzgruppe in 5'-Position und anschließend der Bernsteinsäure-Rest in 3'-Position angefügt werden. Der Baustein sollte danach am Synthesizer im Standard-Phosphoramiditverfahren in das Oligonukleotid eingebaut werden. Nach Ausarbeitung passender Methoden zur Abspaltung und Entschützung der Oligonukleotide sollte ein Peptid, über die aufgespaltene Disulfidbrücke in der Alkylseitenkette des Moleküls, gebunden werden.

Die einzelnen Syntheseschritte des Nukleotidbausteins wurden mittels DC und Gelelektrophorese laufend kontrolliert. Für die Aufreinigung der Substanzen war die Anwendung der Säulenchromatografie geplant. Die darauffolgende Charakterisierung der Produkte erfolgte mit ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie.

3. Materialien und Methoden

Die verwendeten Lösungsmittel und Reagenzien für die Synthese stammen von den Firmen Sigma-Aldrich und Serva.

Für die Säulenchromatografie wurde Kieselgel (60 Å Porendurchmesser 0,035 - 0,070 mm, Firma Acros) als stationäre Phase verwendet. Die Kieselgel-Alufolien (Kieselgel 60 F 254 nm, Alufolie 20x20 cm) für die Dünnschichtchromatografie wurden von der Firma Merck bezogen. Die Entwicklung der entsprechenden DC-Platten erfolgte, unter Kammersättigung, in DC-Entwicklungskammern mit entsprechend geeignetem Laufmittel. Detektiert wurde unter UV 254 nm und gegebenenfalls besprüht mit Seebach Reagenz (2.5% Molybdätophosphorsäure, 1% $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, 6% Schwefelsäure, 90.5% Wasser).

Mittels Varian 500 MHz oder Burker 200 MHz wurden die ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide und deren Konjugate erfolgte durch das Nano-Drop Spektrophotometer ND-1000 von Thermo Fisher. Grundlegend für die Konzentrationsbestimmung war das Lambert-Beersche Gesetz. Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen der Absorption von Licht und der Konzentration der absorbierenden Substanz in Lösung.

Reinigung und Auswertung:

Die Reinigung durch die Säulenchromatografie erfolgte in Säulen unterschiedlicher Größe und unterschiedlichstes zusammengesetztes Laufmittel.

Säulenflüssigchromatographie:

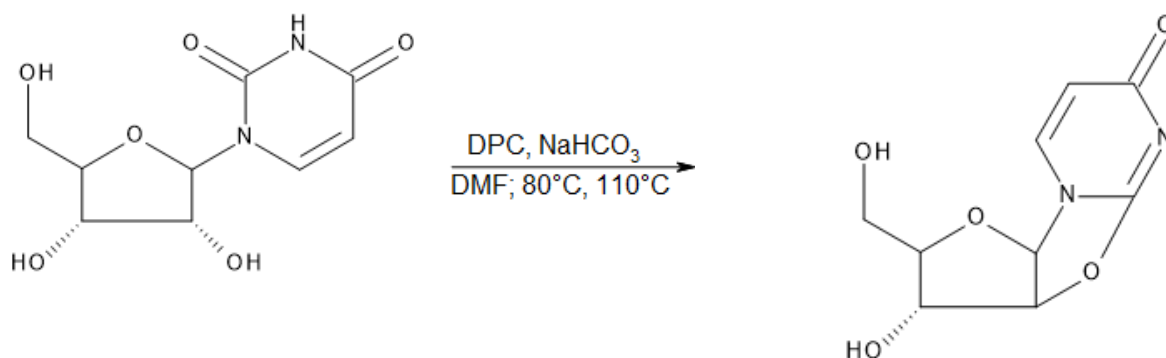
Kieselgel wurde in einem Kolben eingewogen, mit entsprechendem Laufmittel versetzt und aufgeschwemmt.

Daraufhin wurde die Säule, unter ständigem Klopfen, mit Kieselgel gefüllt. Vor dem Aufbringen der Probe wurde die Säule mit Laufmittel gewaschen. Um das Kieselgel zu neutralisieren und die Spaltung des 5'-Trityls zu verhindern, wurde dem Laufmittel Triethylamin (1%) zugesetzt.

NMR-Spektroskopie:

Zur Probenvorbereitung wurden 10 mg der Probe eingewogen und mit 0.75 mL CDCl_3 versetzt. Nach einer fakultativen Filtration wurde die Probe einem NMR-Prüfröhrchen zugeführt.

3.1. Synthese von 2,2'-Anhydro-1-(β -D-arabinofuranosyl)uracil (1)



Im ersten Schritt wurden Uridin (10g, 40.95 mmol) und Diphenylcarbonat (9.56 g, 44.63 mmol) in wasserfreiem DMF (16.7 mL) gelöst und auf 80°C konstant gehalten.

Nach vollständigem Lösen (ca. 2 h) wurde Natriumhydrogencarbonat (0.26 g, 3.07 mmol) zugegeben und die Mischung bei 110°C gerührt. Die Umsetzung wurde mit DC überprüft. Nach 3 h wurde das Gemisch auf Raumtemperatur gebracht und der Niederschlag abfiltriert. Der weiße Feststoff wurde aus dem Lösungsmittel umkristallisiert und im Vakuum getrocknet (weiße Kristalle, 87% Ausbeute).

^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.84(d, J = 10.0 Hz, 1H, H-6), 6.31(d, J = 5.0 Hz, 1H, H-5), 5.89(s, 1H, OH-3'), 5.84(d, J = 10.0 Hz, 1H, H-1), 5.20(d, J = 5.0 Hz, 1H, H-3'), 4.99(s, 1H, OH-5'), 4.38(s, 1H, H-4'), 4.07(m, 1H, H-2'), 3.28(m, 1H, H-5'/1), 3.19(m, 1H, H-5'/2).

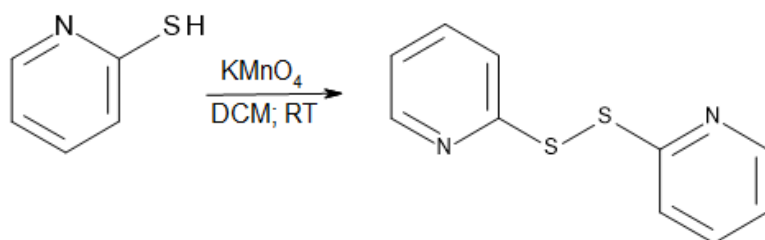
^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 171.20 (C-4), 159.82(C-2), 136.87(C-6), 108.61(C-5), 90.03(C-1'), 89.22(C-4'), 88.74(C-2'), 74.72(C-3'), 60.83(C-5').

ESI-HRMS: mass calculated for $C_9H_{12}N_2O_6Na$ $[M+Na]^+=249.0482$, found 249.0487.

R_f 0.36 (DCM/MeOH 9/1)

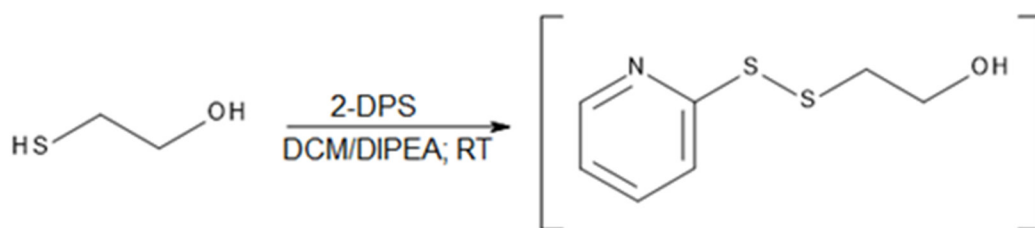
3.2. Synthese von 2'-modifiziertem Anhydrouridin

3.2.1. Herstellung der Alkylseitenkette

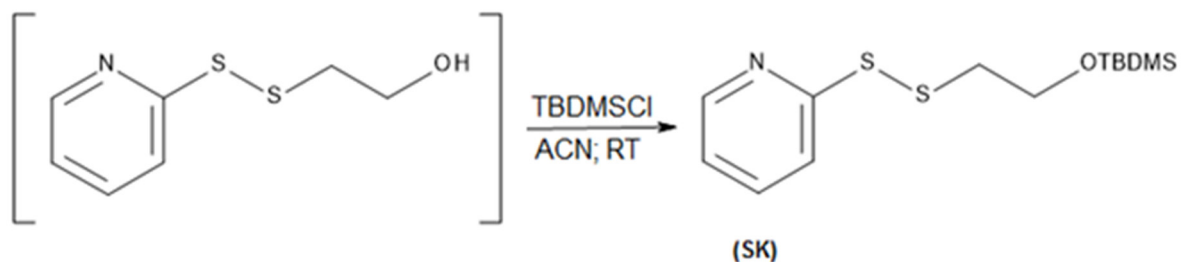


2-Mercaptopyridin (25 g, 224.9 mmol) wurde in 1 L Dichlormethan gelöst. Anschließend wurde $KMnO_4$ (120 g) innerhalb von 15 min. (bei RT) zugegeben.

Alle 30 min. wurde der Reaktionsfortschritt mittels DC (MTBE) überprüft. Nach 2 h wurde das Lösungsmittel am Rotavapor verdampft. Das Rohprodukt 2,2'-Dithiodipyridin 22.6 g (**2**) (102.6 mmol), Ausbeute: 90%) wurde ohne Aufreinigung für die nächste Reaktion eingesetzt.



Im weiteren wurde 2-Mercaptoethanol (6.8 mL, 97 mmol) tropfenweise einer DCM/DIPEA (3/1, 80 mL) Lösung, die 2-DPS (22.6 g, 102.6 mmol) beinhaltete, zugegeben. Nach 16 h wurde das Lösungsmittel unter Vakuum verdampft.



Das Gemisch **(3)** wurde in Acetonitril (130 mL) aufgenommen. Danach wurde Imidazol (37 g) und TBDMSCl (40 g) dazugegeben und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 16 h wurde eingengt und das Produkt mit Säulenchromatografie gereinigt.

S-(pyridine-2-ylsulfanyl)-O-(tert-butyl-dimethylsilyl)-2-mercaptoethanol

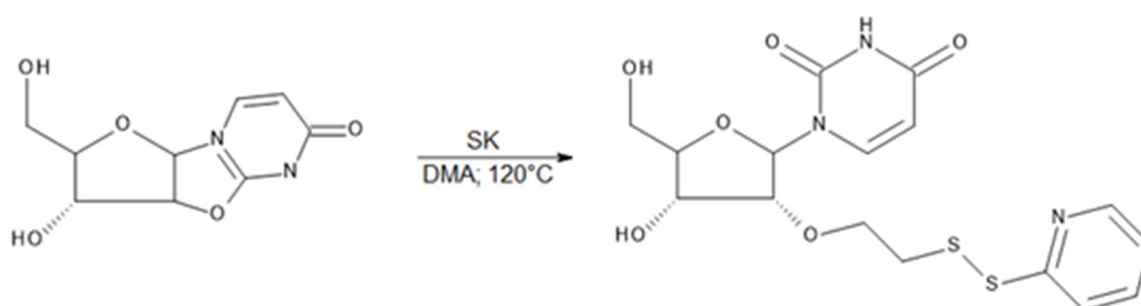
$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) : δ 8.47-8.44 (m, 6'-H, 1H), 8.45 (dd, $J=8, 2$ Hz, 4'-H, 1H), 7.68-7.59 (m, 3'-H, 1H), 7.10-7.04 (m, 5'-H, 1H), 3.85 (t, $J=6$ Hz, H-1, 1H), 2.92 (t, $J=6$ Hz, H-2, 1H), 0.89 (s, *tert*Bu-CH₃, 9H), 0.05 (s, Si-CH₃, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 160.68 (C-2'), 149.68 (C-6'), 137.12 (C-4'), 120.66 (C-5'), 119.73 (C-3'), 61.50 (C-1), 41.65 (C-2), 26.00 (*tert*Bu-CH₃), 18.44 (*tert*Bu-C), -5.15 (Si-CH₃).

HRMS m/z : calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NOS}_2\text{Si}$ 301.0990, found 301.0984.

R_f 0.29 (MTBE/PE 1/9)

3.2.2. Kopplung der Seitenkette



Getrocknetes 2,2'-Anhydrouridin **(1)** (1.7 g, 7.5 mmol) wurde in DMA (10 mL) gelöst. Dieser Lösung wurde Trifluorethanol (1.35 mL, 18.8 mmol) zugegeben.

Nach 5 min. bei RT wurde die aktivierte, geschützte Seitenkette (4.5 g) zugegeben und die Lösung bei 120 °C für 16 h reagieren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde tropfenweise einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung zugegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatografie gereinigt und überprüft.

2'-O-(2-(pyridine-2-ylsulfanyl-thio)-ethyl) uridine

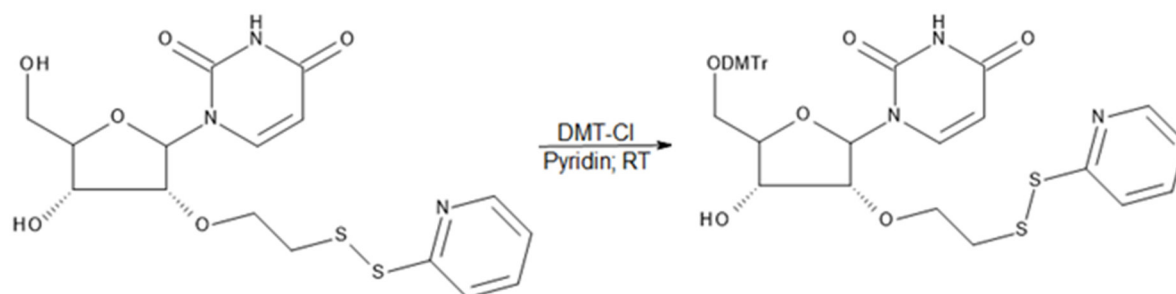
¹H NMR (500 MHz, methanol-d₆) : δ = 8.93 (br s, 1H, ImidNH), 8.62 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H-6), 7.52 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, pyr-6-H), 6.87 (dd, *J* = 10.0 and 5.2 Hz, 1H, pyr-4-H), 6.81-6.75 (m, 1H, pyr-3-H), 6.35 (dd, *J* = 10.0 and 5.0 Hz, 1H, pyr-5-H), 5.5-5.4 (m, 1H, H-1'), 5.22 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H-5), 5.09-4.92 (m, 1H, H-3'), 4.79 (dd, *J* = 10.0 and 4.3 Hz, 1H, H-4'), 4.69-4.63 (m, 1H, H-2'), 3.96 (dd, *J* = 9.8 and 4.7 Hz, 1H, H-5'/1), 3.58 (dd, *J* = 9.8 and 5.0 Hz, 1H, H-1''/1), 3.48 (dd, *J* = 10.0 and 5.0 Hz, 1H, H-1''/2), 3.26-3.21 (m, 1H, H-5'/2), 2.97-2.84 (m, 2H, H-2'').

¹³C NMR (125 MHz, methanol-d₆) : δ = 142.60 (C-4), 135.48 (pyr-2), 129.43 (C-2), 120.66 (pyr-6), 115.35 (C-6), 107.40 (pyr-4), 107.02 (pyr-5), 106.80 (pyr-3), 81.19 (C-5), 68.95 (C-1'), 63.99 (C-2'), 60.57 (C-4'), 47.80 (C-3'), 45.60 (C-1''), 40.16 (C-5''), 19.95 (C-2'').

ESI-HRMS *m/z* : calculated for C₁₆H₁₉N₃O₆S₂ 414.0788, found 414.0794.

R_f 0.36 (MeOH/DCM 1/10)

3.2.3 Verknüpfung der DMTr-Schutzgruppe und des Linkers



Das alkylierte Uridin (**4**) (0.24 g) wurde in Pyridin (2.65 mL) gelöst. Daraufhin wurde 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (0.20 g, 1 eq.) zugefügt und das Reaktionsgemisch 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt mittels DC überprüft.

Um eventuell vorhandene Reaktionsnebenprodukte zu quenchen wurde 1 mL Methanol zugegeben. Anschließend wurden die Lösungsmittel unter Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, nacheinander mit WEK, gesättigter Bicarbonat- und Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die organische Phase wurde eingeeengt und mittels Säulenchromatografie gereinigt. Dabei wurde ein Gradient von 2.5 - 10% MeOH/DCM als Laufmittel verwendet.

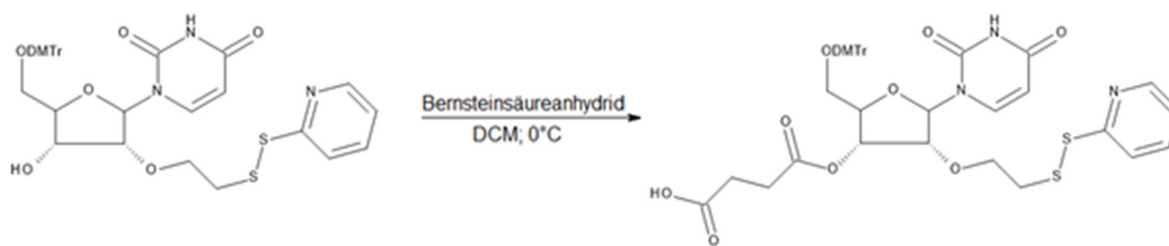
5'-O-(4, 4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-(2-(pyridine-2-ylsulfanyl-thio)-ethyl)uridine

¹H NMR (500 MHz, d₆-Benzene): δ = 9.02 (br s, 1H, ImidNH), 8.27 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, pyr-6-H), 7.90 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-6), 7.55 (d, *J* = 10.0 Hz, 2H, Ph-2,6), 7.41 (d, *J* = 9.8 Hz, 4H, Ar-2,6), 7.31 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, pyr-3-H), 7.20-7.16 (m, 2H, Ph-3,5), 7.07-7.04 (m, 1H, Ph-4), 6.96-6.93 (m, 1H, pyr-4-H), 6.76 (d, *J* = 10.0 Hz, Ar-3,5, 4 H), 6.45-6.42 (m, 1H, pyr-5-H), 5.78 (s, 1H, H-1'), 5.34 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-5), 4.39-4.34 (m, 1H, H-3'), 4.03-3.99 (m, 1H, H-1''/1), 3.94-3.90 (m, 1H, H-4'), 3.70-3.65 (m, 1H, H-1''/2), 3.62-3.57 (m, 2H, H-5'/1,2), 3.36 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H-2'), 3.29 (s, 6H, OMe), 2.95 (br s, 1H, 3'-OH), 2.62 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, H-2'').

¹³C NMR (125 MHz, d₆-Benzene) : δ= 163.53 (C-4), 160.86 (pyr-2), 160.05, 159.99 (Ar-4), 150.82 (C-2), 150.70 (pyr-6), 146.12 (ph-1), 140.11 (C-6), 137.34 (pyr-4), 136.54, 136.35 (Ar-1), 131.41, 131.26 (Ar-2,6), 129.24 (Ph-2,6), 128.99 (Ph-3,5), 128.06 (Ph-4), 121.39 (pyr-5), 120.66 (pyr-3), 114.41, 114.37 (Ar-3,5), 102.80 (C-5), 88.78 (C-1'), 88.07 (trityl-C), 84.01 (C-4'), 83.47 (C-2'), 69.29 (C-3'), 69.23 (C-1''), 62.17 (C-5'), 55.46 (OMe), 39.57 (C-2'').

HRMS m/z : calculated for C₃₇H₃₈N₃O₈S₂ 716.2095, found 716.2098.

R_f 0.41, Meoh/DCM



Das Uridinderivat (**5**) (0.1033 g, 0.1443 mmol) wurde in 4 mL wasserfreiem DCM, welches 3 eq. TEA enthält, gelöst. Danach wurde die Lösung auf 0°C abgekühlt und Bernsteinsäureanhydrid (0.0570 g, 0.5696 mmol) zugegeben. Nach 1 h wurde das Gemisch wieder auf RT gebracht und die Reaktion nach weiteren 2 h mittels DC überprüft. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgedampft, die Substanz in Ethylacetat aufgenommen, mit Natriumhydrogencarbonat, WEK und Natriumchlorid gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. (Auswaage: 120 mg (146.9 nmol), Ausbeute: 75%)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-succinyl-2'-O-(2-(pyridine-2-ylsulfanyl-thio)-ethyl)uridine

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ =9.92 (s, 1H, ImidNH), 8.43- 8.42 (m, 1H, pyr-6-H), 8.03 (d, J = 9.8 Hz, 1H, H-6), 7.89 (d, J = 10.0 Hz, 1H, pyr-4-H), 7.75-7.62 (m, 2H, Ph-3,5), 7.35-7.33 (m, 1H, Ph-4), 7.30-7.21 (d, Ar-3,5, 4 H), 7.17-7.14 (m, 1H, pyr-5-H), 5.86 (d, J = 10.0 Hz, 1H, H-1'), 5.73 (d, J = 10.0 Hz, 1H, H-5), 5.30-5.28 (m, 1H, H-3'), 5.21-5.15 (m, 1H, H-4'), 4.31-4.24 (s, 1H, H-2'), 3.80 (s, 6H, OMe), 3.66-3.64 (m, 1H, H-1''/1), 3.40 (dd, J = 10.0 and 5.5 Hz, 1H, H-1''/2), 3.07-2.92 (m, 2H, H-5'/1,2), 2.79-2.62 (m, 4H, succinyl- CH_2), 2.60-2.49 (m, 2H, H-2'').

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) :

δ =163.10 (succinyl- CO_α), 159.05 (succinyl- CO_β)

150.45 (C-4), 145.51 (pyr-2), 144.75 (Ar-4), 140.58 (C-2), 135.26 (pyr-6), 130.38 (Ph-1), 129.74 (C-6), 128.39 (Ar-1), 128.12 (Ph-3, 5), 128.06 (Ph-2, 6), 127.35 (Ar-2, 6), 126.84 (Ph-4), 125.76 (pyr-5), 117.88 (pyr-3), 117.59 (Ar-3, 5), 113.36 (C-5), 102.02 (C-1'), 88.07 (C-2'), 87.42 (Trit-C), 82.31 (C-4'), 81.37 (C-3'), 69.72 (C-1''), 69.33 (C-5'), 58.60 (OCH_3), 32.20 (C-2''), 24.81 (succinyl- CH_2).

HRMS m/z : calculated for $\text{C}_{41}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{S}_2$ 816.2255, found 816.2246.

3.3. Harzkopplung

Das Nukleotid (**6**) (43.67 mg, 26.76 μmol) wurde in 1 mL wasserfreiem DMF gelöst. Anschließend wurde HOBt (8.1 mg, 52.89 μmol) und DIPEA (22.2 mg, 171,8 μmol) zugegeben. LCAA-CPG (150 mg) wurde eingewogen. Weiters wurde unter Argon BOP (13.25 mg) hinzugefügt und danach das Endprodukt bei RT geschüttelt.

Das Harz wurde mit DMF, MeOH und DCM gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

Capping:

Dazu wurde eine Mischung in einem Verhältnis von 1/1/1.5/15 aus Essigsäureanhydrid/Pyridin/1-Methylimidazol/wasserfreies THF zum Harz hinzugefügt und erneut geschüttelt. Dabei wurden die übrig gebliebenen Aminogruppen acetyliert. Anschließend wurde mit Acetonitril, MeOH und DCM gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

Tritylanalyse:

1.8 mg Festphase wird mit TCA (10.0 mL, 3% in DCM) versetzt und die Lösung bei 498 nm am UV-Spektrophotometer vermessen. TCA wird dabei als Nullabgleich verwendet.

$A=0.490$, $\epsilon=71700$, $d=1.000$ cm

Die Harzbeladung betrug 46.5 $\mu\text{mol/g}$.

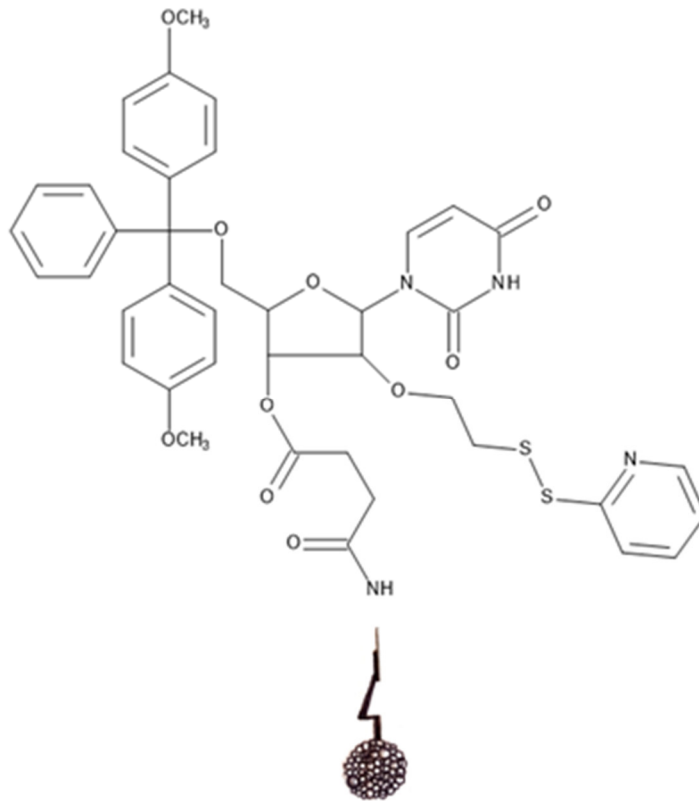


Abb. 3.01: 2'-modifiziertes Oligonucleotid welches über ein Succinyl-Linker an das Harz gekoppelt wurde.

3.4. Oligonucleotidsynthese, Entschützung und Aufreinigung

3.4.1. Synthese am Synthesizer

Die Synthese erfolgte am 10-Säulen RNA-/DNA-Festphasensynthesizer (PolyGen).

Als feste Phase wurde mit dem modifizierten Nucleotid derivatisiertes CPG-LCAA verwendet. Die Durchführung erfolgte vollautomatisch nach dem vorgegebenen Standardprotokoll für das Phosphorthioatverfahren, wobei TETD als Sulfurierungsreagenz verwendet wurde.

Alle Nucleotide hatten in 3'-Position eine Cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphor und an 5'-Position eine DMTr-Gruppe.

Durch Acylierung wurden die Aminogruppen der Basen und durch Methoxylierung die 2'-Position geschützt. Die Seitenkette des modifizierten Bausteins wurde durch Pyridin geschützt.

3.4.2. Abspaltung und Entschützung

Nach erfolgter Synthese wurde die feste Phase zu gleichen Mengen in je zwei Vials verteilt. Es wurden jeweils 0.29 mg des beladenen Harzes entnommen und in zwei Eppendorfgefäße überführt. Beide Gefäße wurden mit Toluol befüllt, sodass das Harz vollständig von der Flüssigkeit bedeckt war. Anschließend wurden beide Gefäße über Nacht bei 30°C geschüttelt. Am darauffolgenden Tag wurde der Überstand abpipettiert und das Harz 3x mit DMF und daraufhin 2x mit DCM gewaschen und anschließend getrocknet.

Nun wurde eine DTT-Lösung (50 mM) hergestellt und zu gleichen Teilen mit DMF verdünnt. Davon wurden je 100 µL den zwei Eppendorfgefäßen zugegeben. Diese wurden dann erneut für 30 min. bei 30°C geschüttelt. Nach erneutem Waschen mit DMF und DCM wurde getrocknet.

Anschließend wurde beiden Eppendorfgefäßen Ammoniak zugegeben. Diese ließ man nun über Nacht im Trockenschrank bei 55°C verweilen. Nach Ablauf der Verweilzeit wurde der Überstand entfernt. Nach dem Waschen mit d.d. Wasser wurde am Lyophilisator getrocknet.

Die Pellets wurden in 20 µL Ammoniumacetat-Puffer gelöst. Daraufhin wurden 60 µL d.d. Wasser und 40 µL Isopropanol zugegeben. Die entstandene Lösung wurde für 15 min. bei 23.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Pellets im Lyophilisator getrocknet, in d.d. Wasser gelöst und am Nanodrop die Konzentration bei 260 nm gemessen. Die gereinigten Oligonukleotide wurden dann bei -20°C gelagert.

3.5. Peptid-Konjugate

Die ungeschützten Oligonukleotide wurden in 170 μL bzw. 185 μL Tris-HCl/EDTA/NaCl-Puffer (20 mM/2 mM/200 mM, pH 7.5) aufgenommen. Das entsprechende Oligopeptid (4 eq.) wurde daraufhin zugegeben und das Reaktionsgemisch bei 25°C für 2 h inkubiert. Die gekoppelten Oligonukleotide wurden mit Sephadex G-50 gereinigt, getrocknet und bei -20°C gelagert.

3.6. Analytik der Oligonukleotide und deren Konjugate

3.6.1. Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Herstellung eines 20%igen Acrylamidgels

7.5 mL der Acrylamid-Stammlösung (40%, 29:1 Acrylamid:bis-Acrylamid), 1.5 mL 10xTBE (Tris-borat-EDTA-Puffer) und 7,2 g Harnstoff wurden vermischt. Um den Harnstoff vollständig zu lösen wurde der Kolben mit dem Gemisch für einige Minuten ins Ultraschallbad gehalten. Anschließend erfolgte die Zugabe von 7.5 μL TEMED und 75 μL APS. Die Lösung wurde rasch in die vorbereitete Apparatur gegossen und mit einem Kamm 10 Taschen geformt. Nach der einstündigen Polymerisation und der Füllung der Kammer mit 1xTBE-Puffer erfolgte ein Vorlauf des Gels für 90 min. bei 150 V. Bevor die Proben aufgetragen werden konnten, wurden die Kammern mithilfe einer Hamilton Spritze gereinigt.

Probenvorbereitung

Jede Probe (1 nmol) wurde mit 10 μL Formamidpuffer versetzt. Danach wurden alle Proben für 3 min. auf 95°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die einzelnen Taschen wurden mit Puffer gewaschen, bevor die Proben aufgetragen wurden, um nicht vollständig polymerisiertes Acrylamid zu entfernen.

Eine Bromphenolblau-Lösung wurde als Marker in die erste Tasche gegeben. Das Gel wurde solange bei 150 V konstant gehalten bis der Marker zwei Drittel der Strecke erreicht hatte.

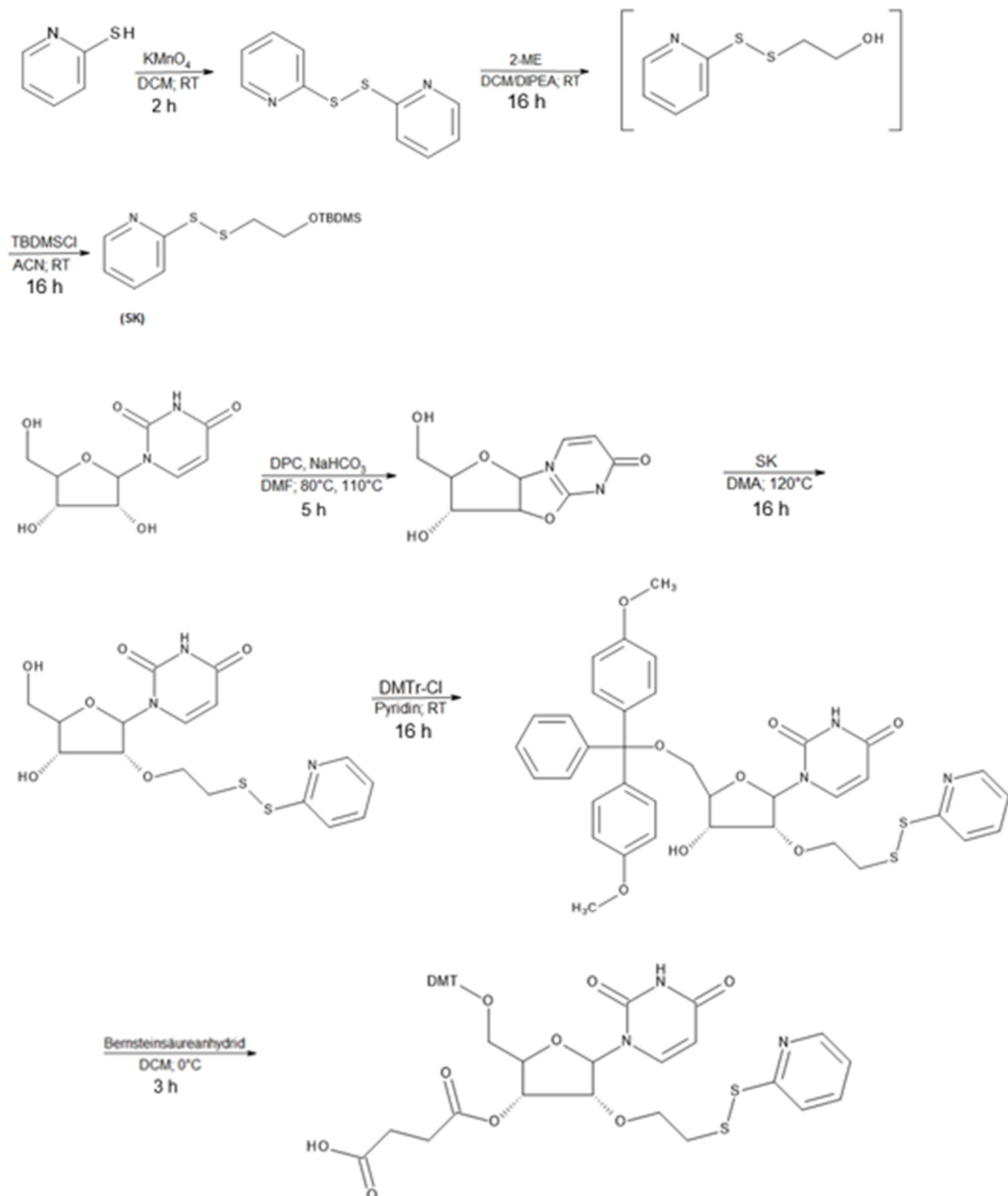
Auswertung

Die Auswertung des Gels erfolgt zum einen unter UV 254 nm Licht und zum anderen durch Methylenblaufärbung. Dazu wurde das Gel solange in eine 2% Methylenblaulösung gelegt, bis die gefärbten Banden sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel 3-4 mal mit Wasser gewaschen und damit entfärbt. Auf diese Weise wurden die Oligonukleotidbanden sichtbar. Das Gel wurde mit einem Calibrated Imaging Densitometer GS-710 (Bio-Rad) digitalisiert und mit der Quantity One 4.6.3, 1-D Analysis Software (Bio-Rad) analysiert.

4. Resultate und Diskussion

4.1. Synthese von 2'-modifiziertem Anhydrouridin mit entsprechenden Schutzgruppen

Syntheschema:



Die Ausgangssubstanz für die Synthese war Uridin. Dieser Baustein sollte dann im Folgenden so modifiziert werden, dass er sowohl einen Linker zur Verknüpfung von Liganden über eine Disulfidbrücke aufweisen sollte, als auch für die Oligonukleotidsynthese am Synthesizer verwendet werden konnte. Das Ziel der Modifikation war die Einführung eines Thiol-Linkers in 2'-Position der Ribose des Uridins. Der Vorteil dieser Modifikation ist, dass es durch Anbindung an dieser Position zu keiner Veränderung am Rückgrat des Oligonukleotids kommt. Außerdem ist durch die Lokalisation der 2'-Position in der kleinen Furche der Doppelstrangnukleinsäurehelix der sterische Einfluss auf die Basenpaarung relativ gering. Um den Einsatz für die Standardmethode der Oligonukleotidsynthese gewährleisten zu können, müssen die reaktiven Gruppen mit geeigneten Schutzgruppen versehen werden. Die spezifische Auswahl ist essentiell, da diese an verschiedenen Zeitpunkten der Synthese und unter unterschiedlichen Bedingungen wieder abgespalten werden müssen. Die Wahl ist also abhängig von den verschiedenen Eigenschaften der jeweiligen Schutzgruppen. Beispielsweise ist die DMTr-Schutzgruppe an der 5'-Position säurelabil und dadurch während der Synthese leicht, schnell und quantitativ abspaltbar. Besonders die Einführung zusätzlicher Funktionalitäten an Nukleinsäurebausteinen und die dazugehörige Auswahl von möglichst orthogonalen Schutzgruppen ist recht komplex, da während der Oligonukleotidsynthese in unterschiedlichen Schritten sowohl saure, als auch leicht basische Bedingungen vorherrschen.

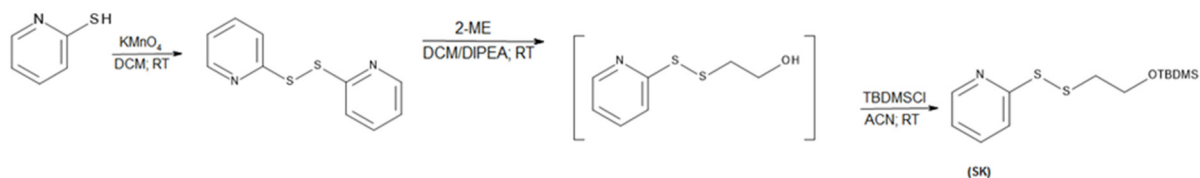
Synthese

Zunächst erfolgte die Herstellung der Alkylseitenkette, die später an die 2'-Position des Uridins angebracht werden sollte. Dazu wurde 2'-Mercaptopyridin unter Zusatz von 2'-Mercaptoethanol zur Reaktion gebracht. Mercaptogruppen sind funktionelle Gruppen, die Disulfidbrücken bilden können, wie es hier der Fall war. Kaliumpermanganat fungierte als starkes Oxidationsmittel. Die 2'-Mercaptopyridinfunktionalität fungierte als Schutzgruppe für das Thiol. Sie wurde verwendet wegen ihrer Fähigkeit zur Aktivierung des Thiols für die Disulfidbindung und ihrer hohen Stabilität.

In einem weiteren Schritt wurde die zuvor hergestellte SK geschützt. Als Schutzgruppe wurde hier ein Silylrest gewählt. Diese Art von Schutzgruppen dienen dazu, reaktive funktionelle Gruppen in eine unreaktive Form zu überführen.

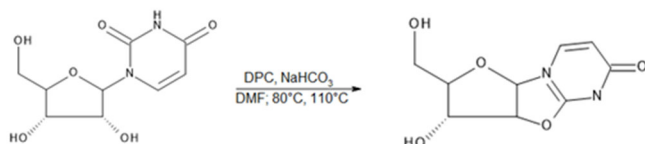
Diese Silizium-organische Verbindung wird üblicherweise eingesetzt um Alkohole oder Phenole vor unerwünschten Reaktionen zu schützen. Alkohole werden ansonsten von Elektrophilen angegriffen oder durch Eliminierungsreaktion entfernt, da sie nukleophil sind.

Bei der Silylschutzgruppe wird das Proton durch einen Siliziumrest ersetzt und ist daher stabil. Hydroxygruppen, die durch eine Silylgruppe geschützt werden, können später direkt, ohne Entschützung, zu einem Ether umgesetzt werden, wie es hier der Fall war. Der Silylether entsteht in Gegenwart von Basen. Je größer die sterische Hinderung am Silizium-Atom ist, umso höher ist die Stabilität. Sie können durch Säuren hydrolysiert werden. Selektiver werden sie durch Fluoridionen gespalten.



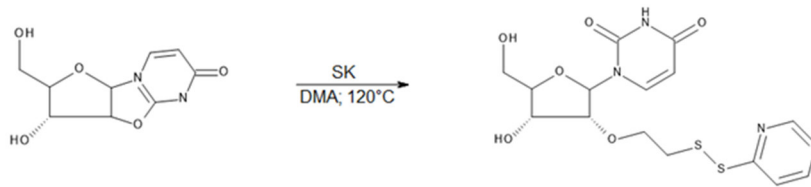
In einem weiteren Schritt erfolgte die Herstellung von 2,2'-Anhydrouridin. Dazu wurde Uridin unter Zugabe von DPC und im Beisein von Natriumbicarbonat als Katalysator zur Reaktion gebracht.

Durch die Verwendung von Anhydrouridin anstelle von Uridin kommt es zu einer verbesserten Regioselektivität. Dadurch wird die 2'-Position für Alkylierungsreaktionen deutlich bevorzugt. Bei Uridin würde auch die 3'-Position im fast gleichen Ausmaße alkyliert werden, und die Auftrennung der 2'- und 3'-Isomere durch chromatografische Methoden ist sehr aufwändig.



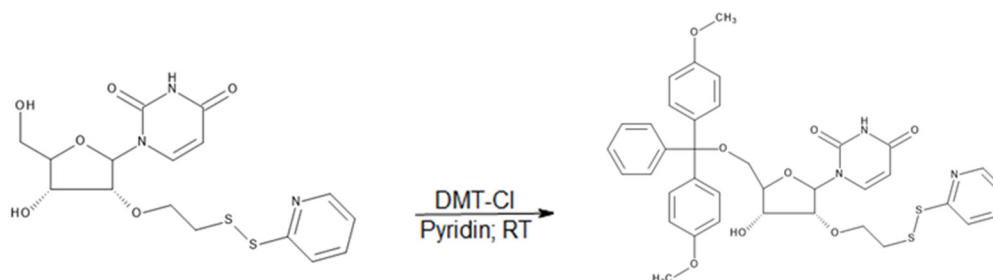
Deshalb wurde die aktivierte Seitenkette für höhere Ausbeuten und eine effektivere Synthese an 2,2'-Anhydrouridin gekoppelt. Die Einzigartigkeit der Silylschutzgruppen ist, dass diese selektiv mit Fluoridionen gespalten werden können.

Für die gezielte Aktivierung der Alkylseitenkette, erfolgt hier darum der Zusatz von Trifluorethanol. Da die nukleophile Ringöffnung säurekatalysiert ist, kommt Trifluorethanol als Lewis-säure zum Einsatz.

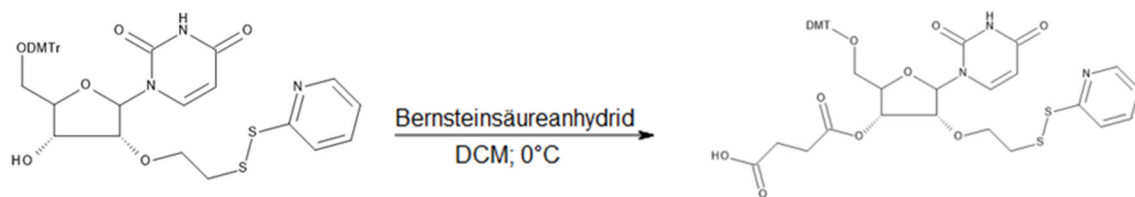


Da die DMTr-Schutzgruppe säurelabil ist, wurde zuerst die 2'-Seitenkette angebracht. Die Tritylschutzgruppe bietet unter anderem den Vorteil, dass sie eine hohe Regioselektivität für primäre 5'-Hydroxyfunktionen besitzt. Daher war es nicht notwendig die 3'- Hydroxygruppe während der Synthese zu schützen. Die primäre Hydroxygruppe ist sterisch ungehindert und daher die nukleophilste Position. Die DMTr-Schutzgruppe ist aufgrund ihrer Eigenschaften die Standardschutzgruppe für die 5'-Position für die Oligonukleotidsynthese, um die Selbstpolymerisation der aktivierten Nucleoside zu verhindern.

Der Nachweis über die Abspaltung des DMTr-Kations erfolgt problemlos, da es zu einer intensiven Färbung des Kations im sauren Milieu kommt. Aufgrund des relativ sauren Charakters des Kieselgels bei der Säulenchromatografie, kann die DMTr-Gruppe leicht abgespalten werden, da diese säurelabil ist. Um diese Reaktion zu verhindern, wird Kieselgel vor der Chromatografie durch Zusatz von Triethylamin neutralisiert.



Im letzten Schritt wurde Bernsteinsäureanhydrid zugegeben. Das Anhydrid reagiert in wasserfreiem Dichlormethan mit der freien 3'-Hydroxygruppe. Der Bernsteinsäurelinker verbindet Festphase und Nucleotid.



4.2. Oligonukleotidsynthese, Entschützung und Aufreinigung

4.2.1. Synthese am Synthesizer

Als feste Phase wurde CPG-LCAA verwendet. Der synthetisierte Uridinbaustein wird mittels Succinat-Linker und Einsatz der Koppelungsreagenzien HOBt und DIC an das Harz gekoppelt. Das Ausmaß der Kopplung wurde mittels Trityl-Analyse bestimmt und betrug $46.5 \mu\text{mol/g}$ Harz. Diese Beladung ist ideal für die Festphasensynthese, um einen effektiven Aufbau des Oligonukleotids zu gewährleisten. Bei zu hoher Beladungsdichte kommt es bei zunehmender Kettenlänge zu sterischen Hinderungen und schlechter Verteilung der Synthesereagenzien.

Die Synthese erfolgte am 10-Säulen RNA-/DNS-Festphasensynthesizer (PolyGen). Der modifizierte Uridinbaustein wurde zur Synthese von 2'-O-methylierten Oligonukleotiden verwendet. Im Reaktionszyklus am Synthesizer verläuft die Synthese von 3' nach 5' im Gegensatz zur biologischen Synthese. Im ersten Schritt erfolgt dann die Detritylierung der säurelabilen Schutzgruppen in 5'-Position wobei die Hydroxygruppe wieder frei wird. Dazu wird 3% Trichloressigsäure in DCM verwendet. Zur Überprüfung dieses Reaktionsschrittes wird das entfernte DMTr-Kation direkt am Synthesizer quantifiziert, da es eine orange Eigenfärbung aufweist.

Im Folgenden wird ein Phosphoramiditbaustein mit Hilfe von ETT aktiviert und kann dadurch gekoppelt werden. Dabei wird der Stickstoff protoniert und bildet eine gute Abgangsgruppe. Die Hydroxygruppe kann angreifen und es entsteht ein Phosphordiester. Als Katalysator wurde ETT verwendet, da dieses Reagenz wegen seines etwas höheren pKa Werts im Vergleich zu 1H-Tetrazol besonders für sterisch gehinderte Bausteine eine schnellere Reaktion und damit eine höhere Ausbeute gewährleistet. Im nächsten Schritt findet die Sulfurisierung zum Phosphorthioat statt.

Im letzten Schritt erfolgt dann das Capping, da die Koppelung nicht immer vollständig abläuft. Dabei werden die noch freien 5'-Hydroxygruppen blockiert. Dies erfolgt mit Hilfe von Essigsäureanhydrid und Imidazol. Bei fehlendem Capping würden die freien Hydroxygruppen im nächsten Schritt mit Phosphoramidit reagieren und es würden Fehlsequenzen entstehen.

4.2.2. Abspaltung und Entschützung

Nach erfolgter Abspaltung der Schutzgruppe mit konzentriertem Ammoniak musste der Schwefel regeneriert werden. Dies geschah durch den Zusatz von DTT. Der Schwefel wäre in Lösung nicht stabil und es würden sich, insbesondere in der Umgebung von Sauerstoff, Dimere bilden. Dies wird durch DTT verhindert. Nach weiterem Vorgehen, wie in Punkt 3.4.2. beschrieben wurde die Konzentration mittels NanoDrop bestimmt. Das Absorptionsmaximum der Oligonukleotide in der Lösung sollte bei 260nm liegen. Andere Peaks stammen von Nebenprodukten.

Oligonukleotid	Sequenz
1	CCU-CUU-ACC-UCA-GUU-AC(A)
2	CCU-CUU-ACC-UCA-GUU-AC(A)

Abb. 4.01: Synthetisierte Oligonukleotide: C= Cytidin, U= Uridin, A= Adenosin, G= Guanosin, **U**= modifiziertes Uridin (mit Thiol-Linker). Das ON-1 ist zweimal modifiziert worden und das ON-2 einmal.

4.3. Peptid-Konjugate

Die entschützten Oligonukleotide wurden nun mit den Peptiden gekoppelt. Dabei handelt es sich um sogenannte zellpenetrierende Peptide. Diese bestehen überwiegend aus positiv geladenen Aminosäuren, damit die Zellaufnahme gesteigert wird.

Es wurden daher lysinreiche Peptide verwendet, die 5-6 Lysinmoleküle und ein Cystein beinhalten. Das Cystein beinhaltet den Schwefel, der für die Bildung der Disulfidbrücke verantwortlich ist.

4.4. Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um ein physikalisches Trennverfahren bei dem Substanzen durch die Wanderung durch ein elektrisches Feld, je nach Ladung und Masse, aufgetrennt werden können. Dabei wurde Polyacrylamid als Matrix eingesetzt.

Durch die Porengröße der Matrix wird bestimmt, wie stark verschiedene Substanzen zurückgehalten werden. Nukleinsäuren sind aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandern daher zur Anode. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs ist dabei vom Masse-Ladungsverhältnis abhängig, das bei Nukleinsäuren vorrangig von der Größe bestimmt wird. Durch den Vergleich mit einem vorhandenen Standard, kann so auch die Länge der Sequenz bestimmt werden.

Beim Vergleich der Banden 1-3 mit den Banden 4 und 5 der Abb. 4.01 sieht man deutlich, dass diese ersten Banden ein geringeres Masse/Ladungsverhältnis aufweisen, da sie deutlich weiter gewandert sind als die anderen beiden Banden. Da die Oligonukleotide, die mit Peptiden gekoppelt wurden (4,5) ein höheres Molekulargewicht aufweisen, werden diese stärker zurückgehalten. Dies lässt den Schluss zu, dass die Kopplung erfolgreich war.

Die Bande 4 befindet sich näher am Startpunkt als die Bande 5. Dies könnte auf die Koppelung mit zwei Peptiden und dadurch bedingt ein höheres Molekulargewicht, zurückzuführen sein.

Durch die Aggregation der Konjugaten mit basischen Peptiden bzw. der stärkeren Assoziation mit Salzen kam es zu einer leichten Verzerrung des Gels.

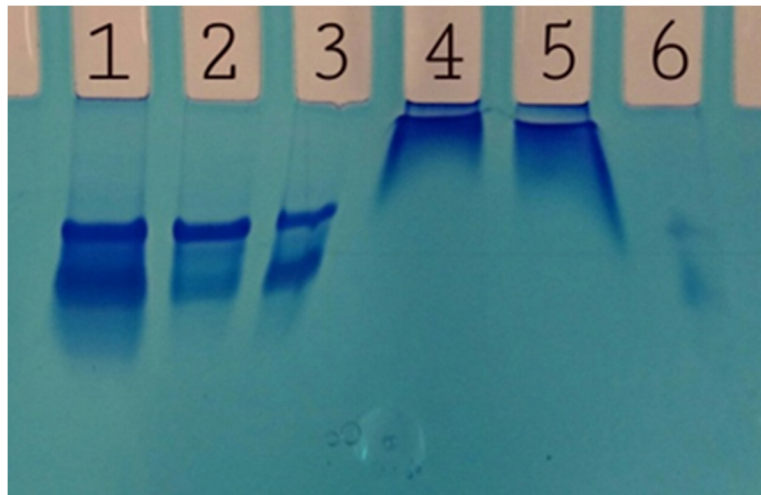


Abb. 4.01: Polyacrylamid-Gel: Tasche 1: ON 1, Tasche 2: ON 2, Tasche 3: ON 3, Tasche 4: ON1 gekoppelt mit C5K (2x), Tasche 5: ON 2 gekoppelt mit C5K (1x), Tasche 6: Standard.

Durch die Konjugation mit Peptiden soll die Zellpenetration und dadurch die Aufnahme in die Zelle verbessert werden. Seit längerem ist bekannt, dass gewisse Peptide eine stabile und effektive Transportform für Oligonukleotide darstellen.

Entscheidend ist die Auswahl der Peptide und des Linkers, über den die Peptide gekoppelt werden. Aufgrund der Entschützung von Thiol-Linker in der endosomalen Umgebung der Zelle ist dieser hervorragend geeignet und wurde deshalb hier auch verwendet.

Die weitere Analyse durch HPLC und Massenspektroskopie wurden während meiner Arbeit noch nicht abgeschlossen. Es müssen noch weitere Untersuchungen unternommen werden, um die pharmakologischen Eigenschaften zu ermitteln.

5. Zusammenfassung

Verschiedene Modifikationen diverser Oligonukleotide haben sich als relativ erfolgreich in Studien erwiesen und so einen Grundstein für die weitere Erforschung und Entwicklung derer gesetzt.

Meine Diplomarbeit beinhaltet die Synthese eines 2'-modifizierten Oligonukleotid. Als erstes erfolgte dabei die Herstellung der Alkylseitenkette, genauer gesagt des Thiol-Linkers, der in einer vorhergehenden Arbeit entwickelt wurde. Aus 2-Mercaptopyridin wurde ein Dimer hergestellt. Dieses reagierte unter Zugabe von 2-Mercaptoethanol zu der gewünschten Seitenkette. Durch das Hinzufügen einer Silyl-Gruppe wurde anschließend die Seitenkette geschützt und durch die Aktivierung an die 2'-Position gekoppelt. Die Synthese konnte wie geplant erfolgreich durchgeführt werden. Nach erfolgter Kopplung und Anbringung der DMTr-Schutzgruppe in 5'-Position, erfolgte die Herstellung eines Succinat-Bausteins und Verknüpfung als Startnucleotid an der Festphase. Mittels DNA-Synthesizer wurde der fertige Baustein in das Oligonukleotid eingebaut. Durch die sorgfältige Auswahl der kompatiblen Schutzgruppen und die Anwendung der Standard-Phosphoramiditmethode konnten erfolgreich die gewünschten, modifizierten Oligonukleotide erhalten werden. Anschließend erfolgte die Kopplung mit zellpenetrierenden Peptiden. Diese lysinreichen Peptide sind positiv geladen und erhöhen damit die Zellaufnahme. Durch das im Peptid beinhaltete Cystein konnte eine Disulfidbrücke gebildet werden über die die Konjugation erfolgte. Die Überprüfung der Kopplung erfolgte mittels Gelelektrophorese. Durch das höhere Molekulargewicht und eine Ladungsreduktion konnte eine Verringerung der Wanderungstrecke festgestellt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Koppelung sich ebenso als erfolgreich erwies.

Die angewendete Methode zur Herstellung der Oligonukleotide und die Koppelung mit Peptiden stellt eine in Zukunft interessante Methode dar, um die Zellaufnahme bestimmter Substanzen zu steigern.

Um therapeutische Oligonukleotide zu optimieren können verschiedene Modifikationen an diesen, als auch am Peptid vorgenommen oder verbessert werden. Die verwendete Methode gewährleistet bereits eine sichere Synthese für Oligonukleotide.

6. Abkürzungen

2'-DPS	2,2'-Dithiodipyridin
ACN	Acetonitril
AON	Antisense Oligonukleotid
APS	Ammoniumpersulfat
BOP	Benzotriazolylxytris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphat
CDCl ₃	Deuteriochloroform
DCM	Dichlormethan
DC	Dünnschichtchromatographie
eq.	Äquivalent
d.d.	doppelt destilliert
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMA	Dimethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMTrCl	Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC	Diphenylcarbonat
DTT	Dithiotreitol
DXR	Doxorubicin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETT	5-Ethylthio-1H-tetrazol
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HGPS	Hutchinson-Gilford-Syndrom
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
KMnO ₄	Kaliumpermanganat
LCAA-CPG	"long chain alkylamine-controlled pore glass"
MeOH	Methanol

mRNA	messenger-RNA
MTBE	2-Methoxy-2-methylpropan
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
NMR	Kernspinresonanz
ON	Oligonukleotid
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
PMO	Phosphoramidat-Morpholino-Oligomer
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SK	Seitenkette
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBDMSCI	tert.-Butyldimethylsilylchlorid
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TETD	Tetraethylthiuramdisulfid (Sulfurierungsreagenz)
THF	Tetrahydrofuran
WEK	demineralisiertes Wasser

7. Referenzen

- 1 Tamm, I., Dörken, B., Hartmann, G. (2001). "Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea?." *Lancet* (London, England). 358(9280), 489-497
- 2 Zamecnik, PC., Stephenson ML. (1978). "Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75(1), 280-284
- 3 Whitesell, L., Rosolen, A., Neckers, LM. (1991). "In vivo modulation of N-myc expression by continuous perfusion with an antisense oligonucleotide." *Antisense research and development*. 1(4), 343-350
- 4 Dias, N., Stein, CA. (2002). "Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms." *Molecular cancer therapeutics*. 1(5), 347- 355
- 5 Agrawal, S., Zhao, Q. (1998). "Antisense therapeutics." *Current opinion in chemical biology*. 2(4), 519-528
- 6 Chan, JH., Lim, S., Wong, WS. (2006). "Antisense Oligonucleotides: from design to therapeutic application." *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 33(5-6), 533-540
- 7 Uhlmann, E., Peyman, A. (1990). "Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle." *ACS Publications*. 90(4), 543-584
- 8 Singh, Y., Murat P., Defrancq, E. (2010). "Recent developments in oligonucleotide conjugation." *Chemical Society reviews*. 39(6), 2054-2070
- 9 Akhtar, S. (1995). "Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics." *CRC Press*. 320
- 10 Bennett, CF., Swayze, EE. (2010). "RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform." *Annual review of pharmacology and toxicology*. 50, 259-293
- 11 Yamamoto, T., Nakatani, M., Narukowa, K., Obika, S. (2011). "Antisense drug discovery and development." *Future medicinal chemistry*. 3(3), 339-365
- 12 Dirin, M., Winkler, J. (2013). "Influence of diverse chemical modifications on the ADME characteristics and toxicology of antisense oligonucleotides." *Expert opinion on biological therapy*. 13(6), 875-888

- 13 Partridge, M., Vincent, A., Matthews, P., Puma, J., Stein, D., Summerton, J. (1996). "A simple method for delivering morpholino antisense oligos into the cytoplasm of cells." *Antisense and Nucleic Drug Development*. 6(3), 169-175
- 14 Winkler, J. (2013). "Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications." *Therapeutic delivery*. 4(7), 791-809
- 15 Stanley, TC. (2007). "Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Applications." CRC Press. 848
- 16 Juliano, RL., Ming, X., Nakagawa, O. (2012). "The Chemistry and Biology of Oligonucleotide Conjugates." *Accounts of chemical research*. 45(7), 1067-1076
- 17 Ming, X., Laing, B. (2015). "Bioconjugates for targeted delivery of therapeutic oligonucleotides." *Advanced drug delivery reviews*. 15, 169-409
- 18 Vivès, E., Schmidt, J., Pèlegri, A. (2008). "Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery." *Biochimica et biophysica acta*. 1786(2), 126-138
- 19 Ruoslahti, E. (1996). "RGD and other recognition sequences for integrins." *Annual review of cell and developmental biology*. 12, 697-715
- 20 Järver, P., Coursindel, T., Andaloussi, S., Godfrey, C., Wood, M., Gait, M. (2012). "Peptide-mediated Cell and In Vivo Delivery of Antisense Oligonucleotides and siRNA." *Molecular therapy. Nucleic acids*. 1, 27
- 21 Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, MA., Mergny, MD., Scherman, D., Demenix, B., Behr, JP. (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(16), 7297-7301
- 22 Wimmer, N., Marano, RJ., Kearns, PS., Rakoczy, EP., Toth, I. (2002). "Syntheses of polycationic dendrimers on lipophilic peptide core for complexation and transport of oligonucleotides." *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 12(18), 2635-2637
- 23 Sessa, G., Weissmann, G. (1968). "Phospholipids spherules (liposomes) as a model for biological membranes." *Journal of lipid research*. 9(3), 310-318
- 24 Fritze, A., Hens, F., Kimpfler, A., Schubert, R., Peschka-Süss, R. (2006). "Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient." *Biochimica et biophysica acta*. 1758(10), 1633-1640

- 25 Chen, D., Cole, DL., Sirvatsa, GS. (2000). "Determination of free and encapsulated oligonucleotides in liposome formulated drug product." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 22(5), 791-801
- 26 Lorenzer, C., Dirin, M., Winkler, A., Baumann, V., Winkler, J. (2015). "Going beyond the liver: Progress and challenges of targeted delivery of siRNA therapeutics." *Journal of controlled release*. 203, 1-15
- 27 Arechavala-Gomez, V., Khoo, B., Aartsma-Rus, A. (2014). "Splicing modulation therapy in the treatment of genetic diseases." *The application of clinical genetics*. 7, 245-252
- 28 Padgett, RA. (2012). "New connections between splicing and human disease." *Trends in genetics : TIG*. 28(4), 147-154
- 29 Kole, R., Krainer, A., Altman, S. (2012). "RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides." *Nature reviews. Drug discovery*. 11(2), 125-140
- 30 Singh, RK., Cooper TA. (2012). "Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics." *Trends in molecular medicine*. 18(8), 472-482
- 31 Maquat, LE. (2004). "Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics." *Nature reviews. Molecular cell biology*. 5(2), 89-99
- 32 Roca, X., Krainer, AR., Eperon IC. (2013). "Pick one, but be quick: 5' splice sites and the problems of too many choices." *Genes & development*. 27(2), 129-144
- 33 Juliano, R., Bauman, J., Kang, H., Ming, X. (2009). "Biological Barriers to Therapy with Antisense and siRNA Oligonucleotides." *Molecular pharmaceuticals*. 6(3), 686-695
- 34 Levin, AA., Henry, SP., Monteith, D., Templin MV. (2001). "Toxicity of antisense oligonucleotides, in *Antisense Drug Technology*." Standley T. Crooke. Ch.9, 201-267

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Sabine Kalchgruber
Adresse: Paulusgasse 5/1/14, 1030 Wien
Telefon: 0660/1569127
E-Mail-Adresse: sabinekalchgruber@live.de
Staatsangehörigkeit: Österreich
Geburtsdaten: 28.10.1988 in Bludenz

Schulische Ausbildung

1995 – 1999 Volksschule Außerbraz
1999 – 2003 Hauptschule Innerbraz
2003 – 2005 HLW Feldkirch
2005 – 2008 BORG Götzis

Studium

seit 2009 Pharmazie, Universität Wien (Erasmusaufenthalt an der Universität von Granada WS 12/13)
seit 2013 Bachelorstudium der Ernährungswissenschaften, Universität Wien

Fähigkeiten und Kenntnisse

Sprachen: Deutsch, Spanisch, Englisch
Grundkenntnisse am PC