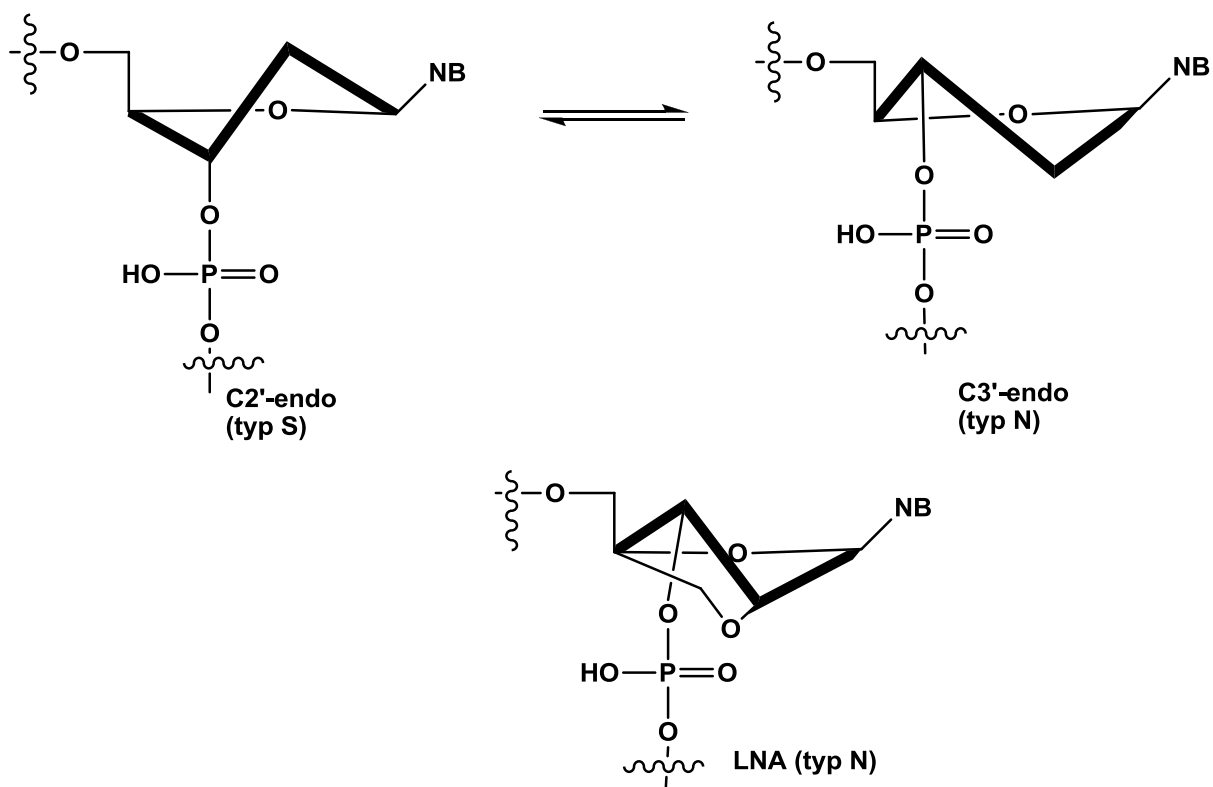


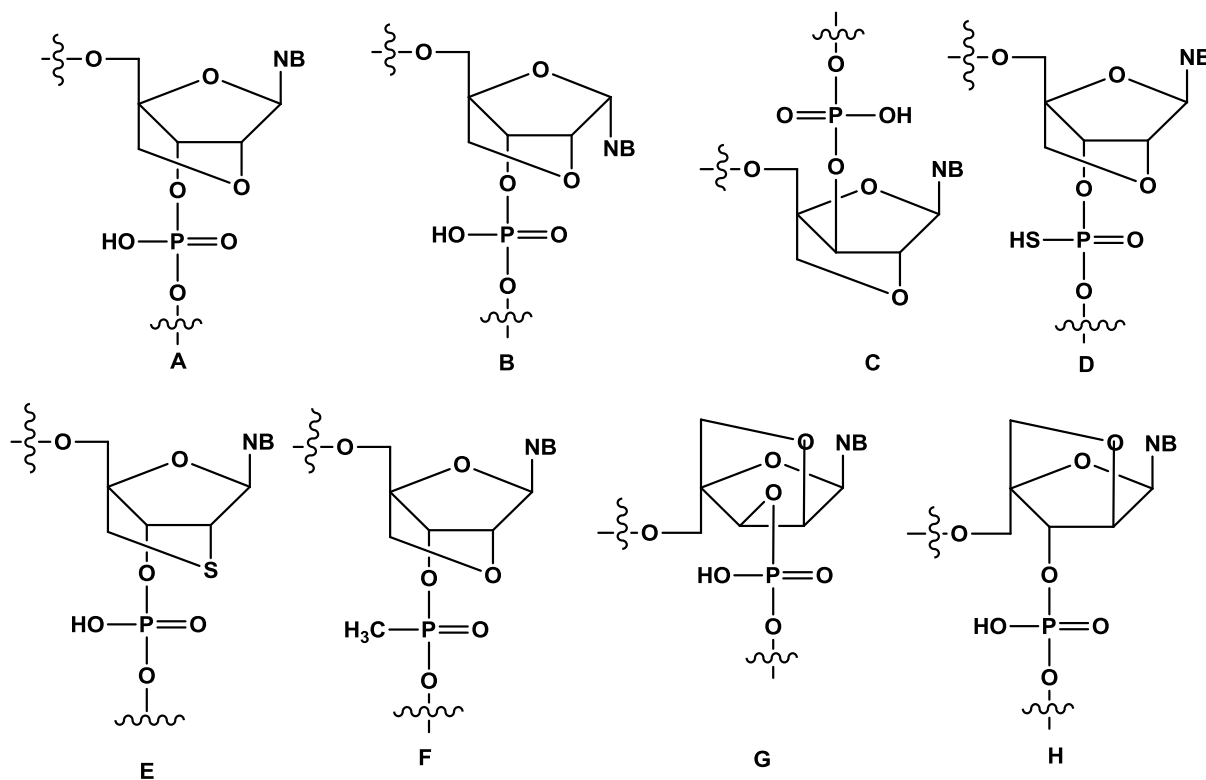


LNA i metody jego syntezy

LNA (Locked Nucleic Acids) nazwa ta obejmuje jeden z typów modyfikowanych kwasów nukleinowych, w których pentofuranozowy fragment cukrowy ma utrwaloną konformację pierścienia (rys. 1). Wiązanie pomiędzy grupą 5''metylenową, połączoną z węglem C-4' pierścienia D-rybofuranozowego, a tlenem grupy 2'-hydroksylowej wymusza konformację C3'-endo (typu N). Taka konformacja, jak wykazały badania stabilności oligonukleotydów, wpływa na wyjątkowo wysoką podatność do hybrydyzacji, tworzenia dupleksów i tripleksów, z innymi cząsteczkami komplementarnych oligonukleotydów. Dodatkowo oligonukleotydy modyfikowane LNA wykazują znaczną stabilność *in vivo*, są nietoksyczne i łatwo mogą być wprowadzone do komórek metoda transfekcji. Pomimo wielu znanych już analogów LNA (rys.2), macierzyste (β -D-LNA) wykazuje jak na razie najlepsze właściwości hybrydyzacyjne.



Rys. 1. Analogia konformacji pierścienia D-rybofuranozowego i LNA



NB - nukleozasada

A – LNA (β -D-LNA); B - α -D-LNA; C - α -D-ksylo-LNA; D – fosforotiolowe LNA; E – 2'-Tio-LNA;

F – metylofosfoniowe LNA; G - α -L-LNA; H - α -L-ksylo-LNA.

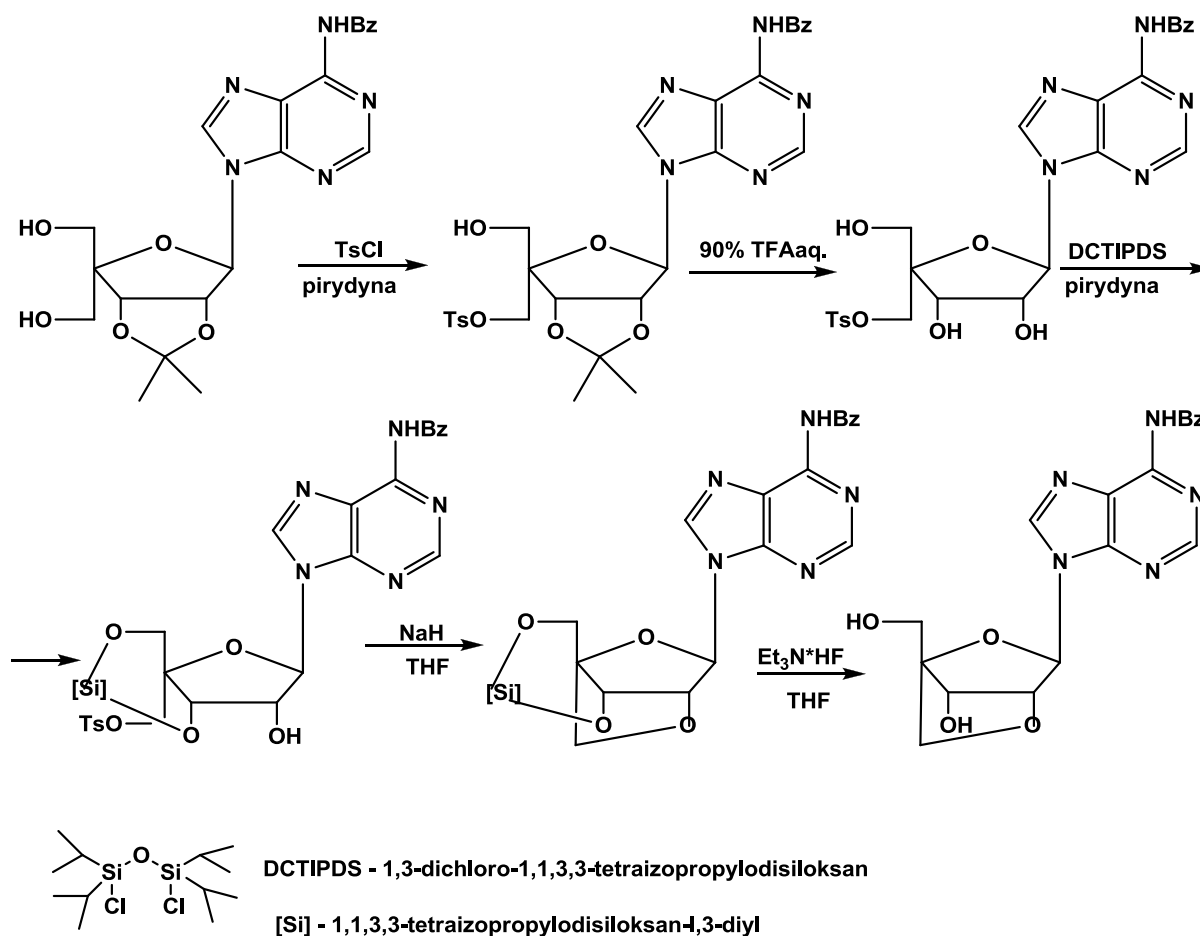
Rys. 2 Typy LNA

Podobnie jak w przypadku innych nukleozydów i w tym wypadku metody syntezy można podzielić na dwie główne grupy: metodę liniową i metodę zbieżną.

Metoda liniowa polega na rekonstrukcji pierścienia cukrowego w już istniejącym nukleozydzie (Schemat 1). Wymaga ona zachowania w trakcie przemian środowiska uniemożliwiającego hydrolizę wiązania glikozydowego, ograniczona jest ona dostępnością nukleozydu wyjściowego, najczęściej syntezy prowadzone są na nukleozydach naturalnych. N-Benzylo- 4'-C-hydroksymetyloadenozynę przeprowadzono w pochodną izopropylidenową w reakcji z acetonem, a następnie poddano tosyłowaniu w warunkach standardowych (chlorek tosyłu, pirydyna). Pochodną tosyłową otrzymano z wyd. 37%. Jako produkt uboczny powstaje pochodna 5'-O-tosylowa z wyd. 13%. Następnie rozszczepiono zabezpieczenie dioksolanowe kwasem trifluoroctowym w temp. pokojowej. W celu zapobieżenia tworzenia się niepożądanych produktów ubocznych, grupy hydroksylowe 3' i 5' zabezpieczono 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraizopropylidenodisiloksanem. Pod wpływem silnej zasady wodoru



sodu, następuje bezpośrednie zamknięcie pierścienia. Powstały [2.2.1]bicykliczny nukleozyd odbezpieczono za pomocą fluorku trietyloamoniowego. Całkowita wydajność procesu to 21% (A. A. Koshkin, V. K. Rajwanshi, J. Wengel, Tetrahedron Letters 39 (1998) 4381- 4384).

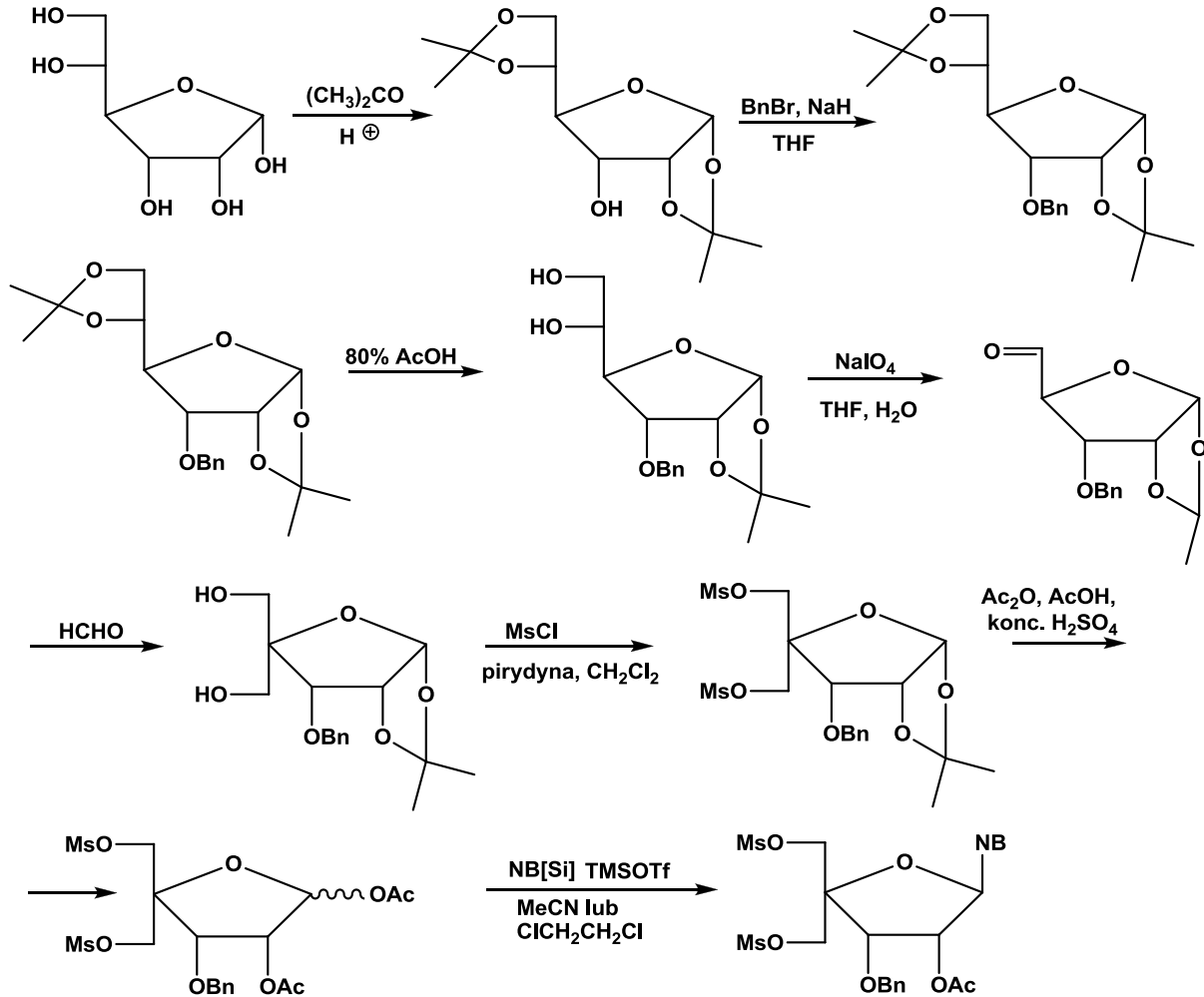


Schemat. Liniowa synteza analogu 6-benzyladenozyny

Znacznie większe możliwości daje metoda zbieżna, gdzie modyfikacje pierścienia cukrowego przeprowadza się przed przyłączeniem zasady. Możliwe jest zatem wprowadzenie dowolnej modyfikowanej zasady azotowej, co znacznie rozszerza możliwości aplikacyjne tej metody. Poniżej przedstawiono klasyczną metodę syntezy LNA (Schemat 2a i 2b). Wyściowy monosacharyd D-allozę poddaje się reakcji z acetonem w typowych warunkach, bezwodny aceton, katalizator kwasowy. Powstaje 1,2;5,6-di-O-izopropylideno D-allofuranooza, w której grupę 3-hydroksylową zabezpiecza się w postaci eteru benzylowego. W kontrolowanej kinetycznie reakcji, rozszczepia się ugrupowanie acetalowe 5,6, i utlenia utworzony wycinalny diol kwasem nadjodowym. Kondensacja z formaldehydem daje zmodyfikowany pierścień cukrowy z dodatkową grupą hydroksymetylową przy węglu C-4 D-rybozy, jak widać zanika jedno centrum stereogeniczne na węglu C-4. W następnym etapie zabezpiecza się grupy hydroksylowe w postaci estrów mesylowych i rozszczepia zabezpieczenie 1,2-O-

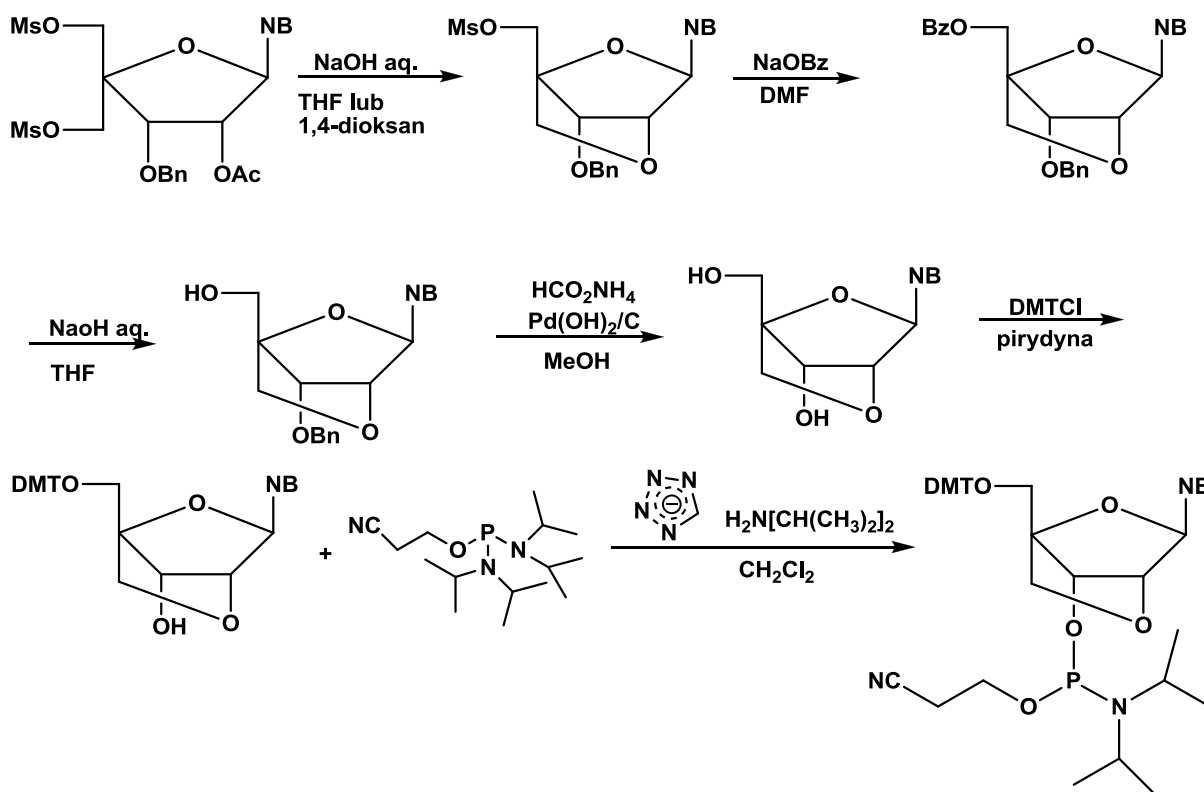


izopropylidenowe. Wolne grupy hydroksylowe przeprowadza się w pochodne octanowe. Taka forma cukru jest dogodna do syntezy nukleozydu. Obecność grupy 2-octanowej zapewni wysoką enancjoelektywność (β -anomer) kondensacji z nukleozasadą. Kondensację przeprowadza się metodą sililową.



NB[Si] - persililowana nukleozasada
NB - nukleozasada pirymidynowa lub purynowa
NB - Th; C⁴Ac; C⁴Bz; A⁶Bz; G²-ibu

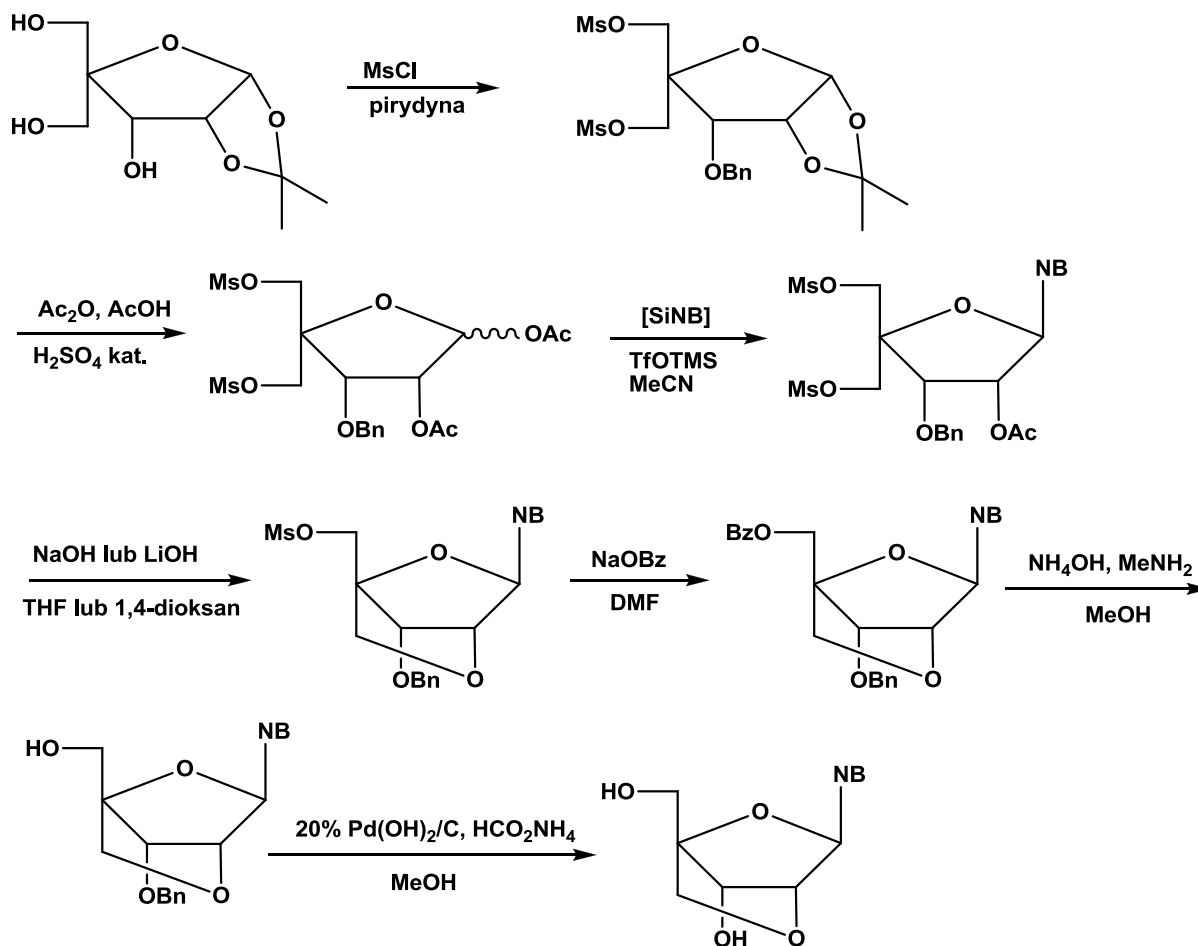
Schemat 2a. Synteza 5'-hydroksymetylo-D-rybozylonukleozydu, pierwszy etap w syntezie LNA (β -D-LNA)



Schemat 2b. Synteza LNA (β -D-LNA) i pochodnych do syntezy oligonukleotydu

W kolejnym etapie następuje utrwalenie konformacji pierścienia rybofuranozowego, utworzenie LNA. W tym celu nukleozyd traktowany jest roztworem zasady, uwolniona grupa hydroksylowa 2'OH jest w położeniu dogodnym do ataku na grupę mesylanową 5'', co prowadzi do zamknięcia drugiego pierścienia. Otrzymany zabezpieczony LNA poddaje się dwu etapowej deprotekcji w celu uwolnienia grupy 3'OH i 5'OH. Dwa następne etapy to przygotowanie nukleozydu do syntezy oligonukleotydu w automatycznym synteźatorze genów. W tym celu grupę 5'-hydroksylową przeprowadza się w eter w reakcji z chlorkiem 4,4'-dimetoksytrytylu a w następnym etapie poddaje fosfitylacji.

Ze względu na wieloetapowość powyższej metody, prowadzone są jej modyfikacje zmierzające do zmniejszenia liczby etapów a tym samym podniesienia wydajności całkowitej. Jedną z takich modyfikacji przedstawia schemat 3.



A. A. Koshkin, J. Fensholdt, H. M. Pfundheller, Ch. Lomholt *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8504.

Schemat 3. Wariant syntezy LNA