

На правах рукописи

КУПРЮШКИН МАКСИМ СЕРГЕЕВИЧ

**СИНТЕЗ ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АМИДОФОСФИТНЫХ НЕНУКЛЕОТИДНЫХ
МОНОМЕРОВ УНИФИЦИРОВАННОГО СТРОЕНИЯ**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

Пышный Дмитрий Владимирович, д.х.н., профессор РАН

Официальные оппоненты:

Позмогова Галина Евгеньевна, д.х.н., профессор
Федеральный научно-клинический центр физико-химической
медицины ФМБА России, зав. лабораторией

Тихонов Алексей Яковлевич, д.х.н., доцент
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова
СО РАН, г.н.с.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова»

Защита состоится « 1 » июля 2016 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090 Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а также на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « » _____ 2016 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Производные олигонуклеотидов широко используются как молекулярные инструменты в современных исследованиях в области живых систем и молекулярной диагностики. В настоящее время универсальным способом получения фрагментов нуклеиновых кислот (НК) является автоматический синтез. Подавляющее большинство модификаций встраивают в синтезируемую олигонуклеотидную цепь в процессе ее наращивания с использованием соответствующим образом функционализированных амидофосфитных синтонов нуклеотидной природы. К настоящему времени разработан широкий спектр коммерчески доступных синтонов для получения олигонуклеотидов, несущих разнообразные группировки как на концах, так и внутри цепи. Однако наиболее часто используемые остовы для создания нуклеотидных синтонов содержат хиральные центры, что может приводить к неоднозначности ориентации функциональных остатков в структуре НК-комплексов. Кроме того, разнообразие структур нуклеотидных остовов затрудняет конструирование олигонуклеотидных производных, несущих набор дополнительных группировок с одинаковой или различной функциональностью. Создание библиотек нуклеотидных синтонов унифицированного строения и различной функциональности является актуальной задачей, решение которой может обеспечить значительное расширение возможностей при направленном конструировании новых олигомерных соединений и олигонуклеотидных производных, в том числе полифункциональных.

С нашей точки зрения, перспективные для широкого использования амидофосфитные синтоны для создания функционализированных олигомеров должны удовлетворять следующим обязательным требованиям, предъявляемым к структуре их каркаса: отсутствие хиральных центров, компактность остова, возможность встраивания в любую позицию олигонуклеотидной цепи в рамках стандартных протоколов автоматического синтеза НК.

Цель данной работы – разработка удобного подхода к получению олигонуклеотидов, несущих одну или несколько функциональных группировок, а также фосфодиэфирных олигомеров нуклеотидной природы, используя набор нуклеотидных амидофосфитных мономеров унифицированного строения.

В рамках поставленной цели решались следующие **задачи**:

- 1) выбор структуры каркаса нуклеотидных амидофосфитных мономеров, обеспечивающей, во-первых, эффективную функционализацию олигонуклеотидов различными группировками и, во-вторых, возможность получения олигомеров нуклеотидной природы в рамках единой технологической схемы;
- 2) создание библиотеки функционализированных мономеров, в состав которых входят гидрофобные, флуоресцентные, заряженные остатки, группы для пост-синтетической модификации, а также группы для синтеза симметрично и асимметрично разветвленных олигонуклеотидов;
- 3) получение и исследование функциональных свойств олигонуклеотидов, модифицированных как отдельными типами нуклеотидных вставок, включая точки ветвления остова, так и набором вставок различной природы.

Научная новизна и практическая значимость работы. В результате проведенной работы был разработан удобный подход к созданию нуклеотидных амидофосфитных мономеров унифицированного строения, синтез которых осуществляется блочным методом. Применимость данного метода продемонстрирована на получении библиотеки мономеров различной функциональности (12 шт.). Выявлены закономерности в эффектах введения соответствующих нуклеотидных звеньев в состав олигонуклеотидов. Получен набор олигонуклеотидов, содержащих от 1 до 3 модифицированных звеньев, а также фосфодиэфирный олигомер нуклеотидной природы.

Основные положения, выносимые на защиту.

1) Осуществлен скрининг различных нуклеотидных остовов(каркасов) для получения амидофосфитных синтонов различной функциональности. Остов на основе N-замещенного диэтаноламина выбран в качестве разветвляющей основы нуклеотидной вставки.

2) Предложен оригинальный подход к получению нуклеотидных амидофосфитных мономеров на основе выбранного N-замещенного остатка диэтаноламина, заключающийся в получении общего соединения-предшественника, удачно сочетающего в своей структуре как группы необходимые для встраивания в олигонуклеотидную цепь, так и реакционно-способную лактоновую группировку.

3) Получена библиотека из 12 функционализированных амидофосфитных мономеров унифицированного строения, содержащих группы различной природы.

4) Создан широкий набор моно- и поли-функционализированных олигодезоксирибонуклеотидов, несущих от одного до трех модифицирующих остатков заданной функциональности во внутренней части углеводно-фосфатного остова и/или на его 5'-конце. Показано, что введение разработанных мономеров приводит к ожидаемому и направленному изменению свойств олигонуклеотидных производных. При этом введение в структуру олигонуклеотида различных комбинаций из нескольких мономеров приводит к комплексному изменению свойств полученного производного.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы в международных рецензируемых журналах и получен Патент РФ. Результаты работы представлены и обсуждены на конференциях: «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, Россия, 2006), II Международная научная конференция «Физико-химическая биология» (Новосибирск, Россия, 2011). 6th Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology, Queen's College, (Cambridge, UK, 2011). Международная научная конференция «Postgenomic Technology for Biomedicine» (Новосибирск, Россия, 2012). 9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (Naples, Italy, 2013). XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids Chemical Biology of Nucleic Acids, (Poznan, Poland, 2014). Science of the Future, (St. Petersburg, Russia, 2014). Russian-British Seminar "Targeting the RNA World : The Future of Nucleic Acid Therapeutics " (Санкт – Петербург , Россия 2015).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 195 страницах, содержит 126 рисунков, 22 таблицы. Библиография включает 180 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выбор структуры остова нуклеотидной вставки

В соответствии с целью, поставленной в данной работе, необходимо разработать удобный подход к получению олигонуклеотидов или олигомеров нуклеотидной природы, несущих в своем составе одну или одновременно несколько функциональных группировок, в том числе с различными свойствами.

На первом этапе исследований в качестве принципиальных групп для введения в состав ахирального нуклеотидного остова создаваемого мономера (помимо двух необходимых для встраивания в растущую олигонуклеотидную цепь) были выбраны стабилизирующая группа и группа, обеспечивающая возможность разветвлять олигонуклеотидную цепь.

Согласно литературным данным существуют два основных подхода к созданию нуклеотидных мономеров с ахиральным остовом. Это использование производных 1,3,5-тризамещенного безнола (тип остова – W_1) или его аналогов, например, 1,3,5-триазина (W_2), либо создание каркаса на основе алифатических аминоспиртов, атомы азота которых являются местами сочленения/ветвления создаваемого остова (W_3) (Рис. 1). В рамках данной работы были опробованы оба подхода. Подход к созданию нуклеотидных разветвляющих мономеров на основе остовов W_1 и W_2 оказался непродуктивным. Выходы создаваемых соединений были крайне малы. Оптимизация синтетических путей с **последовательным введением функциональных групп в структуры предварительно синтезированных триолов** также не привела к приемлемым выходам целевых мономеров. Дальнейшая разработка синтонов на основе указанных остовов была прекращена. После анализа результатов первичных экспериментов было принято решение в дальнейшем реализовать подход с введением необходимых функциональных групп параллельно с формированием остова мономера.

Дальнейшие эксперименты показали, что постепенное создание остова на основе алифатических аминоспиртов, с параллельным введением необходимых функциональных групп является наиболее подходящим синтетическим путем.

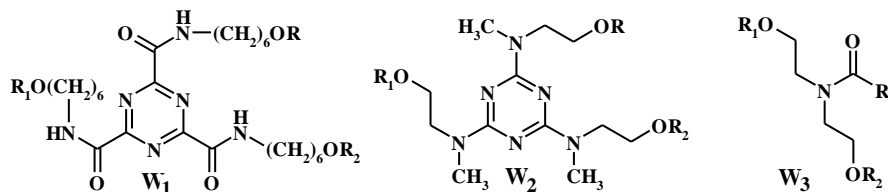


Рис. 1. Остова на основе 2,4,6-тризамещенного триазина (W_1), $N''N''N''$ -тризамещенного амида тримесовой кислоты (W_2) и N -замещенного диэтанолamina (W_3). R – вводимая функциональная

группа; R₁ и R₂ – положения для введения групп, необходимых для встраивания звена в олигонуклеотидную цепь – 4,4'-диметокситригил (DMTr) и (2-цианэтокси)-диизопропиламинофосфинил (CEP).

В качестве компактных и доступных структурных блоков остова, обеспечивающих наличие требуемых гидроксильных и amino-функций, были выбраны диэтаноламин и N-(2-гидроксиэтил)этилендиамин. Для объединения фрагментов остова был выбран остаток глутаровой кислоты – триметиленовый фрагмент обеспечит пространственное разнесение доменов мономера, а получение амидов из вторичных аминов в точках ветвления позволит исключить наличие основных сайтов (в виде третичных аминов) в точках ветвления получаемой структуры.

1.1 Получение акридин-содержащих ненуклеотидных мономеров

Учитывая коммерческую доступность выбранных базовых компонентов каркаса и высокие выходы первых этапов синтеза выбранного подхода, было принято решение на следующем этапе осуществить синтез четырехфункционального мономера, обладающий одновременно и стабилизирующей группой и группой для разветвления олигонуклеотидного остова. В качестве стабилизирующего агента был выбран остаток акридина (6-хлор-2-метоксиакридинил-9), способный обеспечить стабилизацию дуплексов, формируемых модифицированными олигонуклеотидами. В качестве второй вводимой группы была выбрана дополнительная гидроксильная группа, блокированная силильным остатком (TBDMS), “ортогональным” к используемой в автоматическом синтезе 4,4'-диметокситригильной группе (DMTr).

Синтез ненуклеотидного многофункционального амидофосфитного мономера осуществляли согласно представленной схеме (Рис. 1). Первоначально в структуру N-(2-гидроксиэтил)этилендиамина вводили остаток акридинового производного. Далее гидроксильную группу полученного аминок спирта (**I**) блокировали силильной (TBDMS) группировкой в реакции с третбутилдиметилхлорсиланом (**II**, выход 95%). Разветвление каркаса осуществляли обработкой соединения **II** глутаровым ангидридом (**III**, 80%). Карбоновую кислоту **III** превращали в активированный эфир в присутствии N-гидрокисукцинимиды и конденсирующего реагента (DCC) и вводили в реакцию с диэтаноламином (**IV**, 60%). После стандартных процедур диметокситригилации (**V**, 37%) и фосфитилирования (выход 76%) получали искомый продукт (**VI**) (Рис. 2). Одним из наименее эффективных синтетических этапов в представленной схеме было превращение диола (**IV**) в производное (**V**), что обусловлено накоплением в ходе реакции соответствующего ди-О-замещенного побочного продукта. Это обстоятельство частично объясняет невысокий суммарный выход целевого продукта (**VI**) (менее 10 %).

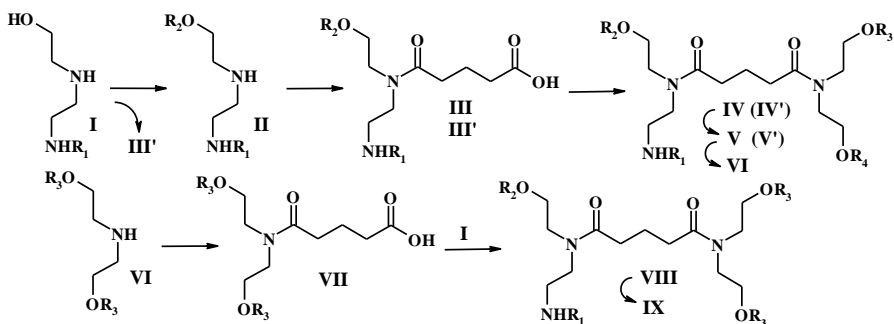


Рис. 2. Схема синтеза мономеров на основе диэтанолamina и N-(2-гидроксиэтил)этилендиамина. R₁ = 6-хлор-2-метоксиакридин-9-ил. II – VI: R₂ = TBDMS; IV: R₃ = R₄ = H; V: R₃ = DMTr, R₄ = H; IV: R₃ = DMTr, R₄ = CEP. III' – V': R₂ = Lev; IV': R₃ = R₄ = H; V': R₃ = DMTr, R₄ = H. VI – IX: R₃ = DMTr; VIII: R₂ = H, IX: R₂ = CEP.

Для создания предшественника мономера с альтернативной защитной группой (Lev) (V') синтетический путь был незначительно изменен (Рис. 2). Производное акридина (I) вводили в реакцию с глутаровым ангидридом с получением бис-ацилированного производного, после гидролиза сложноэфирной группы было получено соединение III'. Последующие стадии получения соединений IV' и V' полностью аналогичны предыдущему пути.

Также был опробован синтетический путь получения мономера с эквивалентными защитными группами (DMTr) на остатке диэтанолamina (Рис. 1): избыточное диметокситриэтирование диэтанолamina (VI), далее реакция с глутаровым ангидридом (VII), активация карбоновой кислоты и реакция с ранее синтезированным производным акридина (I) с получением соединения VIII. После этапа фосфитирования выход искомого мономера (IX) составлял более 25 %.

Таким образом, были разработаны и успешно реализованы различные схемы получения амидофосфитных нуклеотидных мономеров на основе замещенных аминоэтаноламов, содержащих в своем составе остаток акридина.

Следует отметить, что принципиальными моментами, определяющими перспективность использования подобных синтонов, являются стабильность олигонуклеотидных производных, несущих разрабатываемые нуклеотидные вставки, в условиях синтеза и деблокирования олигонуклеотидов и сохранение способности образовывать дуплексы с комплементарными последовательностями НК. Следует отметить, что представленные выше стратегии поэтапной (иерархичной) сборки структуры искомого синтона указывают на возможность реализации и блочного варианта, предполагающего независимый синтез отдельных частей целевого соединения.

1.2 Получение и свойства акридин-содержащих олигонуклеотидов

Встраивание полученных мономеров в модельные олигонуклеотиды проверяли на примере автоматического синтеза серии производных олигодезоксириботимидилатов. Модифицированное звено вводили как на 5'-конец цепи, так и во внутренние позиции олигомеров. Были подобраны условия финального деблокирования (смесь *трет*-бутиламин:метанол:вода, V/1:1:2), позволяющие избежать деградации акридин-содержащих олигонуклеотидов. Гомогенность полученных олигомеров (после выделения их методом оФВЭЖХ) подтверждали данными электрофоретического анализа в денатурирующих условиях (20 % ПААГ, 8 М мочевина). Целевые продукты синтеза олигонуклеотидных производных и побочные продукты, выделенные хроматографически, анализировали с помощью масс-спектрометрии (MALDI TOF / ESI MS).

Данные оФВЭЖХ и масс-спектрометрии показывают, что применение разработанных нуклеотидных мономеров **VI** и **IX** позволяет получать с удовлетворительными выходами (до 50%) лишь олигонуклеотиды с концевыми модификациями. В случае введения модификации внутрь НК-цепи, наблюдаемый выход целевых продуктов не превышал 30%. Установлено, что среди продуктов автоматического синтеза модифицированных олигонуклеотидов присутствует значительное количество 5'-фосфорилированных продуктов, например, pT_6 при синтезе $[R]T_6$, где $[R]$ – нуклеотидное звено, причем T_6 присутствует лишь в следовых количествах. Это указывает на эффективное присоединение нуклеотидного звена к растущей цепи, но в результате дальнейших реакций продукт синтеза подвергается деградации по месту введения вставки.

Использование дополнительной функции разветвления цепи выявило низкий выход разветвленных олигонуклеотидов, что, по-видимому, связано со стерическими препятствиями, создаваемыми соседствующим с дополнительной гидроксильной группой объемным заместителем (производное акридина) на этапе встраивания первого разветвляющего звена.

Помимо побочных продуктов, обусловленных низкой эффективностью удлинения цепи по одному из гидроксильных, были обнаружены продукты, являющиеся результатом частичной деградации встроеного нуклеотидного звена. Структура такого звена по данным масс-спектрометрического анализа предположительно соответствует гидролизу одной из амидных связей глутарамидного линкерного фрагмента. В то же время при синтезе производного с 5'-концевой вставкой подобных продуктов деградации обнаружено не было.

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что частичная деградация цепи олигомеров в случае использования синтона **IX** происходит в ходе автоматического синтеза олигомера. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о существовании объективных проблем при создании и применении компактных функционализированных синтонов, предполагающих разветвление фосфодиэфирного остова олигонуклеотидов.

Влияние предложенных выше акридин-содержащих вставок на эффективность комплексообразования синтезированных олигонуклеотидных

производных характеризовали методом термической денатурации модельных дуплексов, формируемых с участием октадезоксирибонуклеотида–мишени CA_6C . Анализ полученных данных показал, что введение предложенных нами ненуклеотидных вставок во всех случаях приводит к значительной стабилизации формируемых дуплексов. Наличие акридинового остатка повышает температуру плавления гексануклеотидного комплекса на величину от 13.7 до 22.8 °С.

В ходе работы были также охарактеризованы флуоресцентные свойства ряда акридин-содержащих олигонуклеотидов. Обнаружено, что флуоресценция остатков акридина при образовании дуплексной структуры может, как возрастать, так и снижаться. При комплексообразовании олигонуклеотида с внутренней вставкой T_3XT_3 происходит тушение флуоресценции в 2.3 раза (Рис. 3а). При этом олигонуклеотид XT_6 практически не меняет своих характеристик. Наличие двух остатков акридина приводит к обратному эффекту: связывание олигонуклеотида YT_6YT (Рис. 3д) с последовательностью CA_6C сопряжено с разгоранием флуоресценции в 2.4 раза. [X] и [Y] – ненуклеотидные звенья на основе мономеров **VI** и **IX**. Таким образом, интеркалирующий остаток в составе ненуклеотидного звена может играть не только роль дуплекс-стабилизирующего агента, но и выступать в качестве сенсора перехода конъюгатов из свободного состояния в связанное.

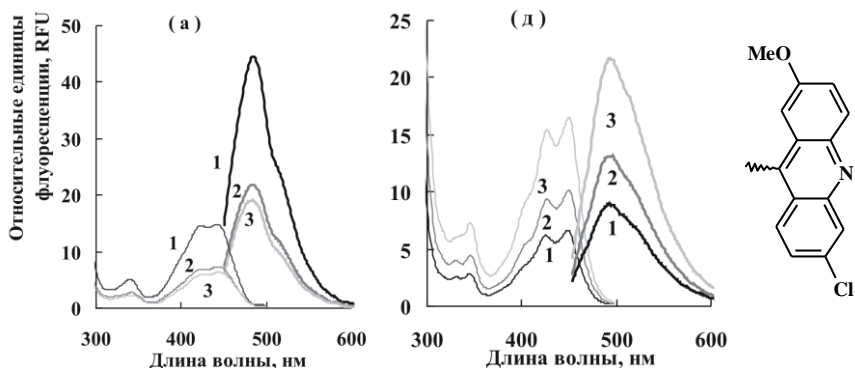


Рис. 3. Спектры флуоресценции акридинсодержащих олиготимидилатов в отсутствие и в присутствии комплементарной цепи CA_6C . а) T_3XT_3 , γ : 0 (1), 10 (2), 40 (3); д) YT_6YT , γ : 0 (1), 11(2), 130(3), где γ - избыток CA_6C ; [X] и [Y] ненуклеотидные звенья на основе мономеров **VI** и **IX** соответственно. Спектры возбуждения ($\lambda_{em}=550$ нм, тонкие линии справа на диаграммах) и испускания (λ_{ex} 400 нм, жирные линии справа на диаграммах). Структура остатка акридина.

1.3 Оптимизация структуры нуклеотидных мономеров. Оксамидный остов

Суммируя данные, полученные на предыдущих этапах работы, наиболее перспективными элементами для варьирования структуры в составе рассматриваемых многофункциональных и компактных синтонов видится подбор ортогональной защитной группы дополнительного ОН-компонента и линкерного фрагмента в каркасе вставки.

Рассматривая дальнейшие пути оптимизации получения ахиральных структур на основе диэтанламинового фрагмента было решено отойти от выбранного ранее остатка глутаровой кислоты, как соединительной части двух каркасных аминспиртов, и перейти к одному из минимально возможных линкерных фрагментов – остатку щавелевой кислоты (Рис. 4). Используя диэтилоксалат и учитывая его бифункциональную природу, становится возможным исключение из синтетического пути стадии активации второго остатка используемой дикарбоновой кислоты при объединении двух фрагментов каркаса.

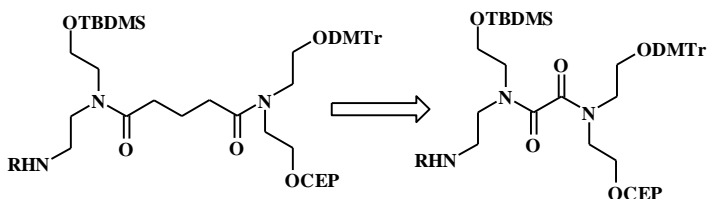


Рис. 4. Структура мономера IX и его аналога с укороченным линкерным участком.

Было установлено, что при проведении реакции диэтил- либо диметилоксалата с незамещенным диэтаноломином, с высоким выходом (> 85%) получается достаточно стабильный циклический продукт X (Рис. 5), обладающий характерным поглощением в УФ области (λ_{\max} : 243 нм; ϵ_{243} : 2170 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

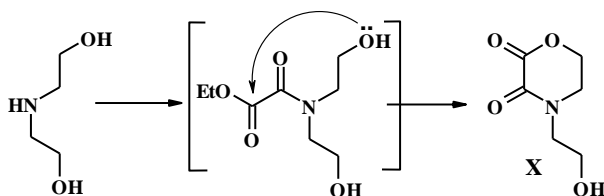


Рис. 5. Получение циклического продукта взаимодействия диэтанолamina с диэтилоксалатом.

Показано, что лактоновая группа соединения X стабильна в условиях диметокситритилирования и, выступая в качестве защитной группы, обеспечивает количественные выходы моно-замещения диэтанламинового фрагмента DMTr-группой. С другой стороны данная группа способна реагировать с алифатическими аминами без дополнительных конденсирующих агентов, при этом высвобождая ранее защищенную гидроксильную группу.

Преимущества разработанного подхода были продемонстрированы в синтезе мономера **XIII**. После диметокситриптирования соединения **X** полученное соединение (**XI**, выход >95%) вводили в реакцию с производным акридина **II** с получением соединения **XII** (90%). После этапа фосфитилирования был получен ненуклеотидный амидофосфитный мономер **XIII** (90%). Суммарный выход по четырем стадиям составил более 55 % (Рис. 6).

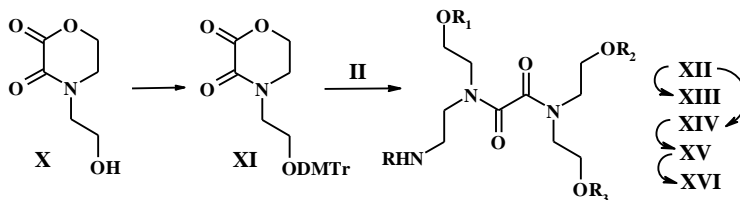


Рис. 6. Схема синтеза мономеров **XIII** и **XVI**, аналогичных **VI** и **IX**, но с минимальной линкерной частью. R = 6-хлор-2-метоксиакридин-9-ил, R₂ = DMTr. **XII**: R₁ = TBDMS, R₃ = H; **XIII**: R₁ = TBDMS, R₃ = CEP; **XIV**: R₁ = TBDMS, R₃ = DMTr; **XV**: R₁ = H, R₃ = DMTr; **XVI**: R₁ = CEP, R₃ = DMTr.

Учитывая высокие выходы осуществленных реакций, синтез аналога мономера **IX**, также содержащего минимальную линкерную часть, проводили исходя из соединения **XII** последовательными этапами диметокситриптирования (**XIV**), деблокирования силильной группы (**XV**) и этапа фосфитилирования (**XVI**).

1.4 Получение и свойства акридин-содержащих олигонуклеотидов на основе мономеров с оксамидным остовом

С использованием синтонов (**VI**, **IX**, **XIII**, **XVI**) был синтезирован ряд линейных и разветвленных олигонуклеотидов, содержащих разработанные ненуклеотидные вставки (X, Y, X* и Y* соответственно) в различных положениях цепи. Показано, что остаток акридинового производного в составе звена с оксалатным линкером также компенсирует дестабилизирующий эффект, вызванный нарушением регулярной структуры остова в составе дуплекса. Однако короткое оксамидное линкерное звено в составе вставки X, находящейся во внутренней части олигонуклеотидной цепи, вызывает меньшее повышение температуры плавления ДНК-дуплекса (T₃XT₃/CA₆C) по сравнению со стабилизирующим эффектом аналогичной вставки с глутарамидным линкером (X*). Вероятно, короткий жесткий линкер не обеспечивает оптимального взаимодействия интеркалирующего остатка с внутренними парами оснований в составе модифицированного дуплекса. В то же время вставки на конце дуплексов вне зависимости от длины линкерного фрагмента практически в равной степени стабилизируют двойную спираль. Существенное влияние природы сочленяющего линкера вставки наблюдается и при анализе изменения флуоресценции олигонуклеотидных конъюгатов при переходе из свободного состояния в двуцепочечное. В случае внутреннего расположения флуорофора, независимо от длины сочленяющего линкера, происходит тушение флуоресценции при образовании дуплекса. Формирование дуплекса с концевым расположением

акридинового производного, характеризуется различным изменением эффективности флуоресценции интеркалирующего остатка в зависимости от длины сочленяющего линкера. Таким образом, даже столь незначительные изменения структуры вставок, как строение линкерного фрагмента, сочленяющего различные ветви ненуклеотидного звена, могут существенно сказываться на свойствах соответствующих олигонуклеотидных производных. Используя мономеры **IX** и **XVI**, был синтезирован ряд модельных олигонуклеотидов для анализа возможности получения симметрично разветвленных олигонуклеотидных конструкций. Было показано, что переход к более жесткому оксамидному линкеру во вставке повышает эффективность получения разветвленных олигонуклеотидных конструкций. Можно сделать заключение, что переход от глутаратного линкера к оксалатному оказался не только оправданным с точки зрения увеличения выходов синтеза соответствующих мономеров, но и решил проблему совместного присоединения последующих мономеров к ненуклеотидному звену.

1.5 Блочный синтез

Анализируя результаты оптимизации синтетических путей превращения акридин-содержащих ненуклеотидных мономеров можно заключить, что выбранный блочный способ синтеза является наиболее рациональным подходом для получения подобных структур. Ключевым этапом разработанного подхода является разделение структуры искомого мономера на два принципиально различных блока: **функциональный** - содержащий желаемую группу для модификации олигонуклеотида, и **каркасный** - отвечающий за встраивание мономера в олигонуклеотидную последовательность. Таким образом, становится возможным независимый синтез этих соединений, объединение которых в единую структуру происходит лишь на последних этапах синтеза, что позволяет значительно увеличить выходы целевого соединения (Рис. 7).

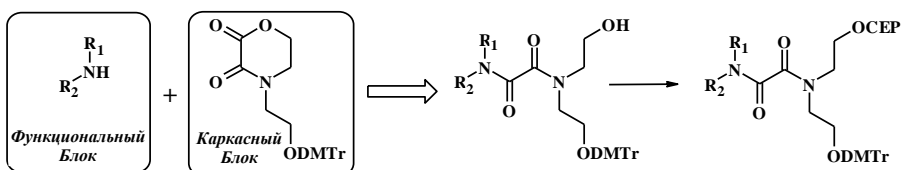


Рис. 7. Схема блочного синтеза амидофосфитного ненуклеотидного мономера из независимо синтезированных структур – функционального и каркасного блоков. R₁ и R₂ – функциональные группы для введения в состав олигонуклеотида.

Кроме того, при необходимости введения другой функциональной группы достаточно лишь синтезировать новый функциональный блок и ввести его в реакцию с уже готовым предшественником каркасного блока.

2. Создание библиотеки амидофосфитных нуклеотидных мономеров унифицированного строения и функционализированных олигонуклеотидов

Следующий этап работы посвящен использованию предложенной нами стратегии для получения широкого набора нуклеотидных мономеров, несущих различные функциональные группы, и создания соответствующих олигонуклеотидных производных с заданной функциональностью.

В качестве вводимых функциональных групп было решено использовать:

1. группу для получения разветвленных олигонуклеотидных конструкций (дополнительная группа (**F₄**, **F₁₀**)); 2. третичную аминогруппу в качестве положительно заряженного модификатора (**F₃**); 3. терминальную алкиновую и первичную амино- группы для постсинтетических модификаций производных (**F₅**, **F₁₁**, **F₂**, **F₆**); 4. остатки холестерина и додециламина в качестве групп, увеличивающих гидрофобность (**F₇**, **F₈**, **F₉**); и 5. пиреновую группу в качестве флуоресцентного остатка (**F₈**) (см. Рис. 8). Возможность создания аналогичной вставки, содержащей остаток акридина описана выше (см. Рис. 6, **XIII** и **XIV**).

Создание набора функционализированных нуклеотидных мономеров проводили, используя, в первую очередь, коммерчески доступные алифатические амины, например, пропаргиламин, додециламин и 3-(диметиламино)-1-пропиламин или 1-пиренилметиламин. Кроме того, были применены предварительно синтезированные моно- и дизамещенные амины и алифатические диамины, в структуре которых одна из первичных аминогрупп либо блокировалась трифторацетильным остатком, либо несла модифицирующие функциональные остатки, например, холестерина. Структуры нуклеотидных мономеров, полученных с применением разработанной стратегии блочного синтеза, представлены на Рис. 8.

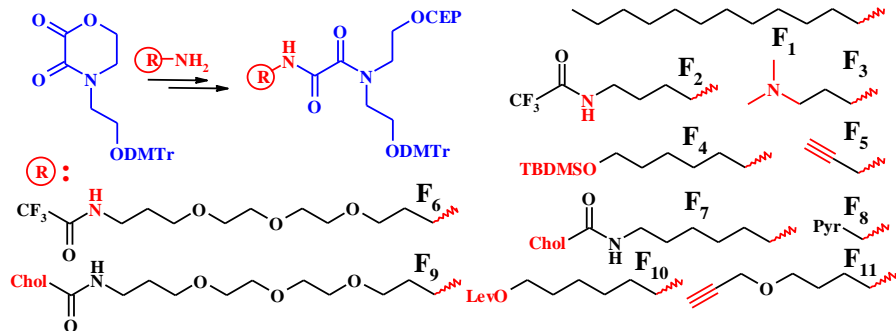


Рис. 8. Схема получения библиотеки функционализированных нуклеотидных мономеров на основе остова унифицированного строения. **F₁-F₁₁** - структуры функциональных групп. Chol и Prg – соответственно остатки холестерина и пирена.

Выходы создаваемых амидофосфитных мономеров в среднем составляли 70%, в расчете на количество универсального блока – 4-(2-(4,4'-диметокситритилокси)этил)морфолин-2,3-диона. Строение промежуточных

соединений и нуклеотидных синтонов доказывали с помощью ^1H , ^{13}C и ^{31}P ЯМР. В большинстве случаев эффективность введения нуклеотидных вставок составляла более 80 %. Это обеспечивало приемлемые выходы (>50 %) олигонуклеотидных производных, несущих, в частности, на 5'-конце три подряд вставки с остатками додециламина (Рис. 9). Структуру олигонуклеотидных производных, синтезированных с использованием данных модификаторов, подтверждали с помощью масс-спектрометрии (MALDI TOF или ESI MS) (Табл. 1).

Таким образом, полученные синтоны могут быть введены в одну или ряд заданных позиций синтезируемого олигонуклеотида вне зависимости от его длины и нуклеотидного состава. Продемонстрирована возможность сочетания различных синтонов из разработанного набора для получения множественно функционализированных олигомеров, в том числе и нуклеотидной природы (Табл. 1). Доказано, что введенные с помощью нуклеотидных вставок функциональные группировки придают олигонуклеотиду заданные свойства. В составе выделенных олигонуклеотидных производных остатки первичных аминогрупп и терминальных алкиновых группировок пригодны для пост-синтетической модификации. Так, использование азидо-содержащего производного флуоресцентного красителя на основе Cu_3Z в реакции Cu(I) -катализируемого циклоприсоединения позволило получить соответствующие конъюгаты с олигонуклеотидами, несущими остатки пропаргил- или 4-(2-пропинилокси)бутиламина (Табл. 1). Увеличение числа введенных в олигонуклеотид остатков додециламин- или холестерин-содержащей вставки ступенчато повышает наблюдаемую гидрофобность полученного конъюгата (см. Рис. 9). Вставки, несущие остатки акридина или пирена, позволяют создавать флуоресцентные олигонуклеотидные зонды (см. Рис. 3 и 10), обладающие повышенным сродством к комплементарным последовательностям ДНК. Нуклеотидная вставка, несущая в боковой цепи О-защищенный остаток алифатического спирта, позволяет, после селективного удаления TBDMS или Lev группировок, создавать разветвленные олигонуклеотидные конструкции (см. Рис. 10). Полученные модификаторы с остатками протонированных при $\text{pH} \sim 7$ алифатических первичных и третичных аминов могут оказаться полезными в качестве, например, цвиттерионных линкерных звеньев при создании многофункциональных олигонуклеотидных конструкций.

Следует отметить, что нуклеотидный остов, вводимый в состав олигонуклеотидных производных, выдерживает стандартные условия деблокирования (концентрированный водный аммиак 48 ч при 25°C). Однако, в случае 5'-концевого расположения нуклеотидного звена необходимо оставлять концевую диметокситритильную группу при проведении аммонолиза. В противном случае доказано, что свободная концевая гидроксильная группа способствует деградации фрагмента N-замещенного диэтанолamina.

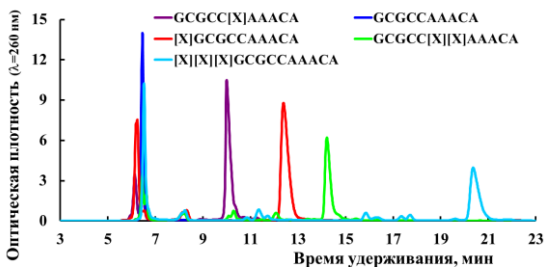


Рис. 9. Пример профиля офВЭЖХ разделения реакционных смесей олигонуклеотидов, содержащих от 1 до 3 нуклеотидных звеньев, и контрольного декануклеотида.

[X] – нуклеотидное звено, несущее остаток додецила (F_1).

Таблица 1. Структуры ряда полученных олигонуклеотидов. [X] и [Y] – нуклеотидные звенья унифицированного строения несущие различные группы-модификаторы: DMA – F_3 ; Chol – F_7 ; DD – F_1 ; NH_2 – F_6 ; Pyr – F_8 ; Acr – остаток акридина; Cy_3 – цианиновый остаток; Alk – F_{11} ; Alk^* – F_5 ; FAM – остаток флуоресцеина, введенный используя коммерчески доступный мономер.

Последовательность 5' – 3'	Модификация	MALDI-TOF / ESI MS [M]	
		Теор.	Найдено
[X]TTTTTT	X = [DMA]	2086.51	2086.79
A[X][X][X]GCGCCAAACA		4305.12	4314.67
[X]TTTTTT	X = [Chol]	2513.20	2510.05
TTT[X]TTTTTT		3425.80	3425.15
GCGCC[X]AAACA	X = [DD]	3412.51	3413.68
GCGCC[X][X]AAACA		3818.97	3820.15
[X][X][X]GCGCCAAACA		4225.44	4226.74
[X]TTTTTT	X = [NH_2]	2204.65	2204.79
TTT[X][X]TTTTTT		3558.66	3557.85
[X][X]GCGCCAAACA	X = [Pyr]	3910.86	3912.93
GCGCC[X][X]AAACA		3910.86	3913.25
[X]GCGCC[X]AAACA		3910.86	3913.15
[X][X][X]TTTTTT	X = [Alk] Y = X + Cy_3	3110.49	3111.90
GCGCC[X]AAACA		3354.34	3355.28
GCGCC[Z]AAACA		3894.10	3896.50
GCGCC[X]AAACA	X = [Alk*] Z = X + Cy_3	3282.24	3286.11
GCGCC[X][X]AAACA		3558.42	3560.76
GCGCC[Z]AAACA		3822.99	3823.49
GCGCC[Z][Z]AAACA		4637.92	4640.01
[X]TTTTT[Y]T	X = [Acr] Y = [Pyr]	2896.84	2896.63
[X][Y][X][Y][X]T		3190.66	3183.60
[FAM][Y][X]TTTTTT		3434.30	3434.25
[Y][Y][Y][Y][Y][FAM]		3071.92	3070.41

3. Свойства функционализированных олигонуклеотидов

3.1 Полифлуорофорные конструкции, содержащие остатки пирена и акридина

Далее была продемонстрирована возможность использования библиотеки нуклеотидных мономеров при создании комбинированно модифицированных олигомеров.

Для изучения эффектов влияния взаимной удаленности полиароматических структур на интенсивность флуоресценции был получен набор олиготимидилатов, несущих флуоресцирующие остатки акридинового производного (**X**) и пирена (**Y**). Флуорофоры вводились в различные положения гексатимидилатной последовательности. Было установлено, что введение пирена в состав акридин-содержащего олигонуклеотида приводит к резкому снижению интенсивности флуоресценции акридина. Это наблюдается как в случае одноцепочечного олигомера, так и в составе комплементарного комплекса. Показано, что, изменяя взаимное расположение флуорофорных звеньев в последовательности, можно модулировать разницу флуоресцентных сигналов при различных состояниях системы в гибридизационном анализе. Так, комплементарное связывание олигонуклеотидных производных **XTTTTTT** и **YTTTTTT** практически не меняет интенсивность флуоресценции акридина. В то же время в случае разнесения двух флуорофоров пентатимидилатным фрагментом, **XTTTTYT**, переход от одно- к двуцепочечному состоянию повышает эффективность флуоресценции акридина почти в 4 раза.

Более того, были синтезированы модельные гексатимидилатные последовательности, несущие на 5'-конце нуклеотидные фрагменты, содержащие до трех флуорофорных остатков - различные сочетания в составе нуклеотидного фрагмента остатков флуоресцеина, акридина и пирена. Данный набор полифлуорофор-содержащих олигомеров был использован в качестве модельных зондов для гибридизационного анализа. В качестве ДНК-мишеней использовали модельный олигонуклеотид CA_6C и набор матриц, содержащих дополнительно на обоих концах последовательности фрагменты, формирующие шпильчатые структуры (Рис. 10). Таким образом, в созданных системах появляется возможность проследить эффекты, связанные с изменением флуоресценции не только при связывании с комплементарной последовательностью, но и с изменением локального окружения флуорофора – конец дуплексной структуры (комплекс с мишенью [n]), одноцепочечный разрыв ([0]), одно([1]) или три ([3]) неспаренных основания между дуплексными фрагментами (см. Рис. 10).

Из диаграммы видно, что флуоресценция олигонуклеотидного зонда, содержащего лишь 5'-флуоресцеин (**F**) – при общей хорошей интенсивности сигнала крайне слабо зависит как от состояния системы, так и от нуклеотидного окружения в дуплексе (Рис. 10, столбцы F). При введении дополнительных флуорофоров (остаток акридина **A** и/или пирена **P**) общая интенсивность сигнала падает, однако появляется чувствительность к состоянию системы. Так, например, в случае свободного состояния [wo] зонда с AF испускание

Конкатамерные структуры формировали на основе пары олигонуклеотидных последовательностей XY и X'Y', в которых 15-нуклеотидные фрагменты X и X', а также Y и Y' комплементарны друг другу. Взаимодействие олигонуклеотидов такого типа должно приводить к образованию линейных полимерных структур (Рис. 11А). Для получения более сложных структур первоначально использовали системы, содержащие разветвленные олигонуклеотиды, например, системы [XY + (X')₂Y'] и [(X)₂Y + (X')₂Y']. Однако в этих случаях методом АСМ выявить высокомолекулярные структуры не удалось. Возможно, большая плотность расположения точек ветвления такой структуры препятствует формированию протяженных конкатамерных комплексов, но не исключает сборку компактных трудно регистрируемых ассоциатов.

Протяженные ассоциаты удалось зарегистрировать при использовании другой олигонуклеотидной системы, содержащей как несимметрично разветвленные олигонуклеотиды (например, X(Z)Y), так и олигонуклеотиды, несущие “линкерные” участки цепи, позволяющие пространственно разносить точки возможного ветвления полимерных цепей (например, система [XL₁ + L₂Y' + L₂L₁']). Таким образом, ветви X и Y разветвленного олигонуклеотида X(Z)Y участвуют в образовании конкатамерной структуры, а боковая ветвь Z остается доступной для других типов взаимодействия, например, ответвления от регулярной линейной структуры конкатамера. Так, используя 50-звенный олигонуклеотид Z'Н, где участок Z' (15 н.), комплементарный боковой ветви разветвленного олигонуклеотида (ветвь Z олигонуклеотида X(Z)Y), и фрагмент Н (35 н.), образующий дуплексную шпильечную структуру длиной 15 п.н., удалось зарегистрировать высокомолекулярные структуры с изломами (Рис. 11Б). Наиболее сложно организованные полимерные структуры – сети – зарегистрированы при использовании систем с разветвленными олигонуклеотидами, содержащими в боковой цепи взаимно комплементарные фрагменты Z и Z' (Рис. 11В). Таким образом, разработанные нуклеотидные точки ветвления обладают заданной функциональностью. Такие структуры могут быть перспективными для разработки наноконструкций на основе ДНК, в том числе, для создания средств внутриклеточной доставки олигонуклеотидных агентов [Gusachenko O.N., 2008].

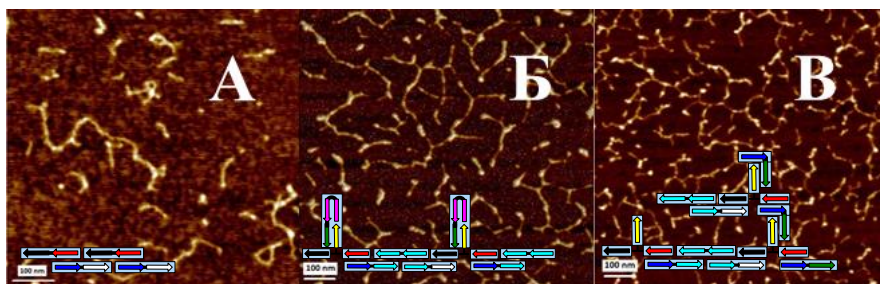


Рис. 11. Данные АСМ анализа конкатамерных структур: линейных (А), содержащих боковые шпильки (Б), содержащих в боковой цепи взаимодействующие олигонуклеотидные цепи (В).

3.3 Гидрофобные олигонуклеотиды для трансфекции эукариотических клеток

Выше была продемонстрирована возможность направленного изменения гидрофобности олигонуклеотидов при введении в их структуру остатков додециламина (**F**₁). Учитывая, что повышенная гидрофобность олигонуклеотидов способствует проникновению их в эукариотические клетки, была предпринята попытка создания новых вариантов внутриклеточных систем доставки на основе додецил-модифицированных ДНК-комплексов. Рассмотрен подход, в котором додецил-модифицированная последовательность выступает в роли транспортной цепи – доставщика комплементарного ей олигонуклеотида. В качестве объектов доставки были использованы флуоресцеин-меченные олигонуклеотиды с различной структурой рибозо-фосфатного остова: фосфодизэфирным (PO), фосфотиоатным (PS) и фосфорилгуанидиновым (PX) остовом [Kupryushkin M.S., 2014].

По данным проточной цитометрии было установлено, что флуоресцеин-меченные олигонуклеотиды, содержащие различное количество додецильных остатков, сами по себе эффективно взаимодействуют с клетками HEK293. При этом, эффективность такого взаимодействия резко возрастает при переходе от структур с одним (D1) или двумя (D2) остатками додециламина к структурам, содержащим три гидрофобных звена (D3). В случае олигонуклеотида D3 наблюдаемая эффективность трансфекции оказывается выше, чем при использовании классического способа доставки олигонуклеотидов с помощью Lipofectamine2000TM (Рис. 12А).

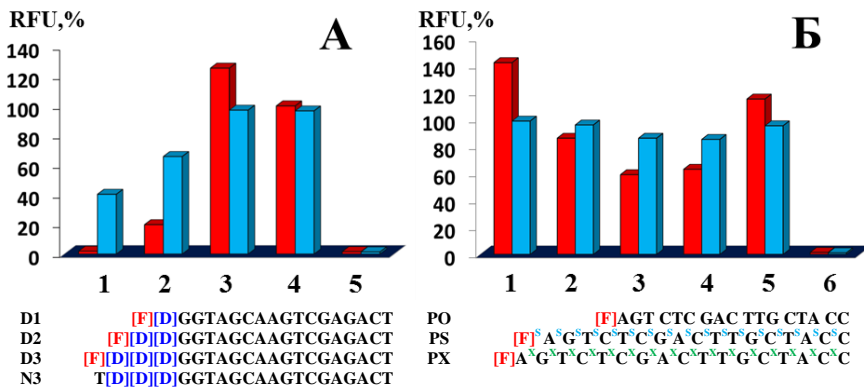


Рис. 12. Данные проточного цитофлуорометрического анализа клеток HEK293 после их взаимодействия с додецил-содержащими олигонуклеотидами или дуплексными структурами на их основе. Структуры модифицированных олигонуклеотидов. [D] и [F] – нуклеотидные звенья с остатками додецила и флуоресцеина соответственно. (А): D1 (1); D2 (2); D3 (3); (+)контроль PO+Lipofectamine2000TM (4); (-)контроль: PO (5). (Б): D3 (1); N3+PO (2); N3+PS (3); N3+PX (4); (+)контроль PO+Lipofectamine2000TM; (-)контроль PO. Голубые столбцы – процент трансфицированных клеток, красные – относительная интенсивность флуоресценции клеток.

Кроме того, в составе дуплекса с таким олигонуклеотидом-доставщиком в клетку проникают различные олигонуклеотидные производные, не содержащие липофильных остатков в своей структуре (Рис. 12Б.). Такой подход

представляется перспективным для разработки систем доставки различных терапевтических агентов на основе олигонуклеотидных производных как с отрицательно заряженным (PO или PS) остовом, так и с электронейтральным остовом, что показано на примере использования новых фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (PX).

Таким образом, в данной работе апробировано несколько подходов к созданию функциональных нуклеотидных мономеров для автоматического синтеза НК. Найден новый оригинальный подход, позволяющий путем блочного синтеза получать наборы мономеров различной функциональности на базе унифицированного нуклеотидного ахирального остова. Функциональная значимость синтезированных амидофосфитов доказана созданием олигонуклеотидных производных с заданными свойствами. На основе созданных нуклеотидных синтонов показана принципиальная возможность получения не только многофункциональных олигонуклеотидных производных, но и фосфодиэфирных олигомеров нуклеотидной природы.

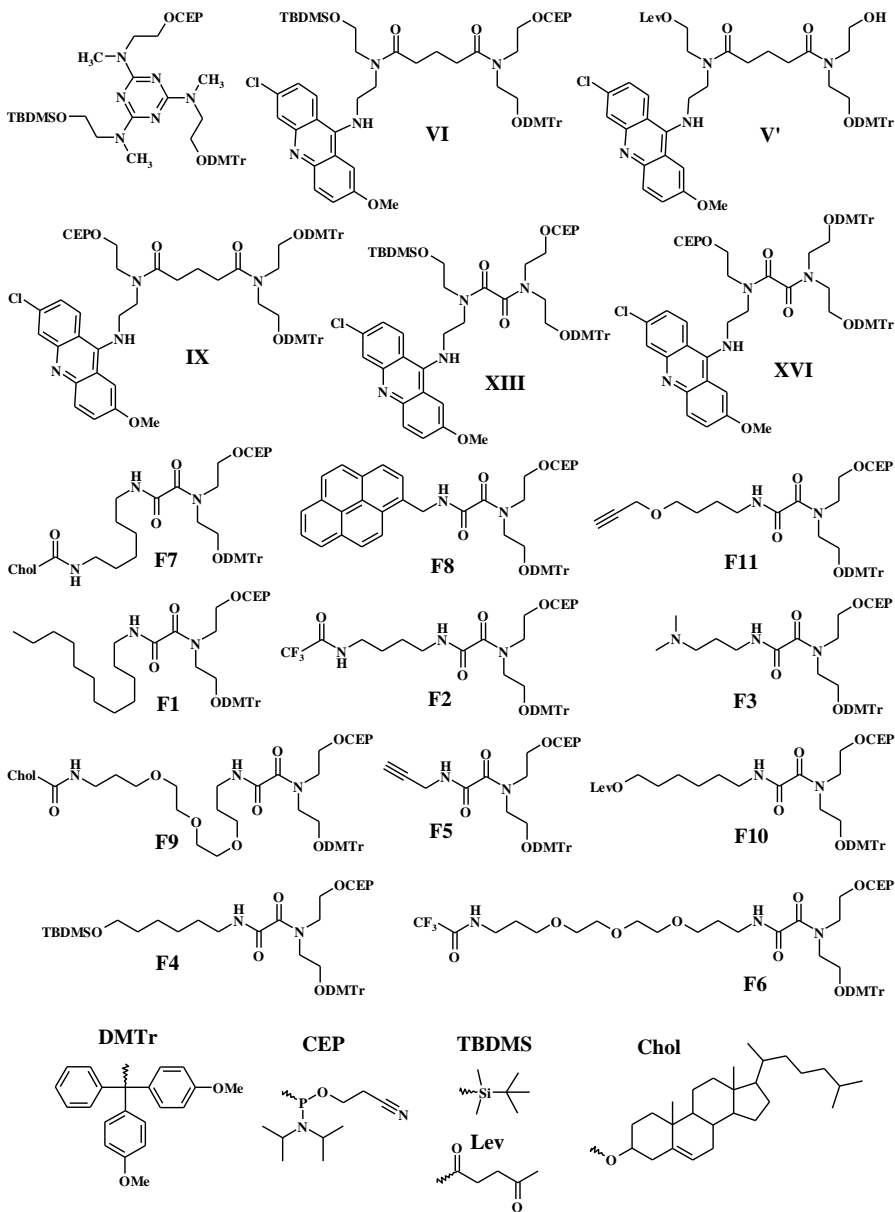


Рис. 13. Структуры основных полученных в работе соединений.

ВЫВОДЫ

1. Осуществлен скрининг различных нуклеотидных каркасов. Показана перспективность (и ограничения) использования остовов, содержащих N-замещенный диэтаноламин в качестве разветвляющей основы нуклеотидного каркаса. Получаемые каркасы обладают всеми заявленными свойствами: отсутствие хиральных центров, компактность остова, возможность встраивания в любую позицию олигонуклеотидной цепи и множественное введение таких нуклеотидных мономеров в рамках стандартных протоколов автоматического синтеза НК.

2. Предложен оригинальный подход к получению нуклеотидных амидофосфитных мономеров на основе выбранного N-замещенного остатка диэтанолamina, заключающийся в получении общего соединения-предшественника, 4-(2-(4,4'-диметокситритилокси)этил)морфолин-2,3-диона, сочетающего в своей структуре как группы, необходимые для встраивания в олигонуклеотидную цепь, так и реакционно-способную лактоновую группировку. Взаимодействие данного соединения с различными функционализированными алифатическими аминами и последующий этап фосфитилирования приводит к получению амидофосфитных нуклеотидных мономеров, содержащих желаемую функциональную группу на унифицированном оксамидном каркасе.

3. Создана библиотека функционализированных мономеров, содержащих: гидрофобные группы (остатки холестерина и n-додецила); дуплекс-стабилизирующие группы (остатки пирена и акридина); группы, несущие положительный заряд (остаток диметиламина); группы для пост-синтетической модификации олигонуклеотидов (остатки первичного алифатического амина и терминального алкина), а также группы обеспечивающие возможность синтеза симметрично и асимметрично разветвленных олигонуклеотидов.

4. Получен широкий набор моно- и поли-функционализированных олигодезоксирибонуклеотидов, несущих от одного до трех модифицирующих остатков заданной функциональности во внутренней части углеводно-фосфатного остова и/или на его 5'-конце, а также олигомеров нуклеотидной природы.

Доказано, что введение созданных нуклеотидных вставок каждого типа приводит к ожидаемому и направленному изменению свойств олигонуклеотидных производных (повышение гидрофобности, стабилизация комплементарных ДНК-комплексов, возможность пост-синтетической модификации, получение разветвленных олигонуклеотидных конструкций).

Показано, что введение в структуру олигонуклеотида различных комбинаций из нескольких функциональных нуклеотидных вставок (тип/число вставок/ положение в цепи) приводит к комплексному изменению его свойств, приводя к существенному изменению флуоресцентных свойств пирен-акридиновых производных и к значительному увеличению эффективности захвата клетками додецил-содержащего олигонуклеотида и его комплементарных комплексов при переходе от монозамещенного производного к тризамещенному.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. **Купрюшкин М.С.**, Пышный Д.В. Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот с помощью олигонуклеотидных производных. III. Синтез и исследование свойств олигонуклеотидов, несущих бифункциональную нуклеотидную вставку // Биоорганическая химия. – 2012. – Т. 38 – С. 706–720.
2. **Купрюшкин М.С.**, Пышный Д.В. Удобный метод получения амидофосфитов нуклеотидных вставок для создания функционализированных олигонуклеотидов // Биоорганическая химия. – 2012. – Т. 38 – С. 745–749.
3. **Kupryushkin, M.S.**, Konevets, D.A., Vasilyeva, S.V., Kuznetsova, A.S., Stetsenko, D.A., Pyshnyi, D.V. Oligonucleotide functionalization by a novel alkyne-modified nonnucleosidic reagent obtained by versatile building block chemistry // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. – 2013. – V. 32 – P. 306-319.
4. **Kupryushkin, M.S.**, Nekrasov, M.D., Stetsenko, D.A., Pyshnyi, D.V. Efficient Oligonucleotide Functionalization by New Achiral Nonnucleosidic Monomers // Org. Lett. – 2014. – V. 16 – P. 2842-2845.
5. Патент РФ № 2460721 С1: «Способ получения ахиральных нуклеотидных вставок для модификации олигонуклеотидов» / **Купрюшкин, М.С.**, Пышный, Д.В. – 2011107337/10, заявл. 25.02.2011, опубл. 10.09.2012, Бюл. №25.