



УДК 577.113.6

© 1993 В. А. Ефимов, И. Н. Пашкова,
А. Л. Калинин, О. Г. Чахмахчева

СИНТЕЗ КОНЬЮГАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

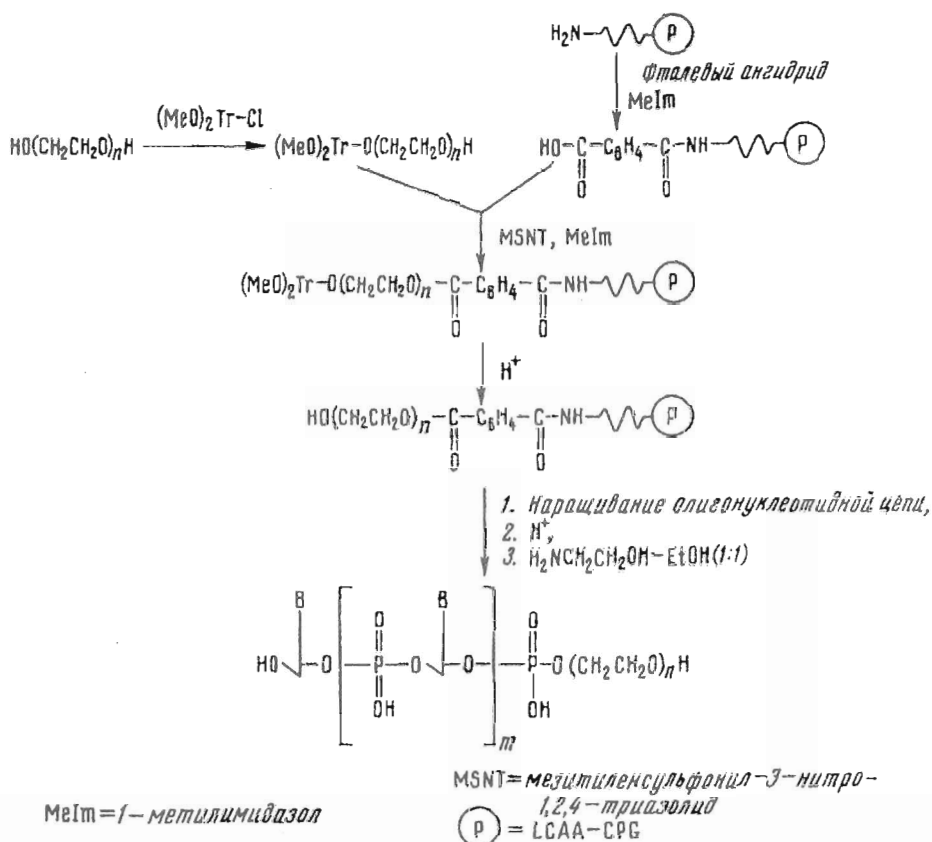
*Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

Разработан быстрый способ синтеза модифицированных олигонуклеотидов, содержащих на 3'-, 5'- или 3'- и 5'-концах молекулы остатки полиэтиленгликоля, с целью изучения их эффективности в качестве антисенс-реагентов.

В последние годы широкое распространение получили исследования по использованию антисенс-олигонуклеотидов в качестве высокоспецифичных ингибиторов экспрессии генов и репликации вирусов и созданию на их основе нового поколения лекарственных средств [1]. В основе этой методологии лежит способность олигонуклеотидов связываться с комплементарными последовательностями ДНК и РНК. Однако практическому использованию антисенс-олигонуклеотидов препятствуют их низкая проникающая способность сквозь клеточные мембраны и быстрая нуклеазная деградация в цитоплазме клеток. Одним из путей решения этой проблемы является химическая модификация антисенс-олигонуклеотидов, в частности использование фосфотиоатсодержащих фрагментов нуклеиновых кислот, в которых один из кислородов в межнуклеотидной связи заменен на остаток серы [2]. Недавно было показано, что с этой целью могут использоваться конъюгаты олигонуклеотидов с липидами [3]. Другим перспективным подходом может стать применение конъюгатов олигонуклеотидов с полиэтиленгликолем (PEG).

Известно, что введение остатков PEG в белки повышает стабильность последних в клетке, защищая от протеолитического расщепления, и одновременно снижает их иммуногенность [4]. В то же время прибавление в реакционную смесь PEG повышает скорость ферментативной реакции лигирования ДНК, ускоряет процессы слияния клеток и гибридизации нуклеиновых кислот [5]. В последнее время были получены данные, что конъюгаты олигонуклеотидов с PEG устойчивы к расщеплению экзонуклеазами *in vitro* и к деградации в сыворотке, а также хорошо проникают через клеточные мембраны [6]. В течение ряда лет PEG различного размера использовался в качестве растворимого носителя для крупномасштабного синтеза коротких олигонуклеотидов, однако в этих экспериментах остатки PEG удалялись с олигонуклеотида после окончания элонгации цепи. Так, в работах проф. Бонора и сотр. [7] остатки PEG прикреплялись к одной из концевых HO-групп олигонуклеотида посредством ацильной связи, которая расщеплялась при полном деблокировании олигомера действием аммиака.

Для изучения возможности использования конъюгатов олигонуклеотидов с PEG в антисенс-экспериментах нами был разработан простой и быстрый метод синтеза 3'-, 5'- и 3', 5'-конъюгатов. Использовался PEG с различной молекулярной массой в интервале 1000—6000. Синтез конъюгатов проводили твердофазным методом, в



качестве носителя были взяты пористые стеклянные шарики (LCAA-CPG). В отличие от ранее опубликованной работы [7] олигонуклеотид присоединялся к PEG через 3'-фосфатную группировку.

Для присоединения остатков PEG к носителю нами также была использована ацильная связь. В первых экспериментах носитель функционализировался действием янтарного ангидрида, как это было описано нами ранее [8]. Однако впоследствии оказалось, что присоединенный через остаток янтарной кислоты к носителю PEG слишком легко удаляется в мягких щелочных условиях и в значительной мере теряется в процессе наращивания олигонуклеотидной цепи, а также при хранении носителя. Поэтому сукцинильный остаток был нами заменен на фталоильный, который обеспечивал достаточно прочное присоединение PEG к носителю (схема).

Для присоединения PEG к фталированному носителю использовалось соответствующее моно(диметокситритильное) производное PEG ((MeO)₂Tr-PEG). Реакция проводилась в присутствии 1-метилимидазола и мезитилсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазолида. Полученный таким образом носитель содержал 5—25 мкмоль остатков (MeO)₂Tr-PEG на 1 г, причем с увеличением размеров PEG уменьшалось его количество, присоединенное к носителю. Полученный таким образом носитель использовался для автоматического синтеза целевых 3'-конъюгатов олигонуклеотидов в стандартных условиях, рекомендованных для фосфитамидного метода [9].

Для получения 5'- и 3', 5'-конъюгатов с PEG на последней стадии наращивания цепи вместо мононуклеотида в качестве нуклеотидного компонента в реакцию конденсации вводилось фосфитамидное производное тритилированного PEG [10]. Помимо фосфитамидного метода для получения модифицированных PEG олигонуклеотидов нами были опробованы твердофазные Н-фосфонатный и быстрый фосфотриэфирный методы [11, 12], которые также оказались высокоэффективными для синтеза подобных соединений.

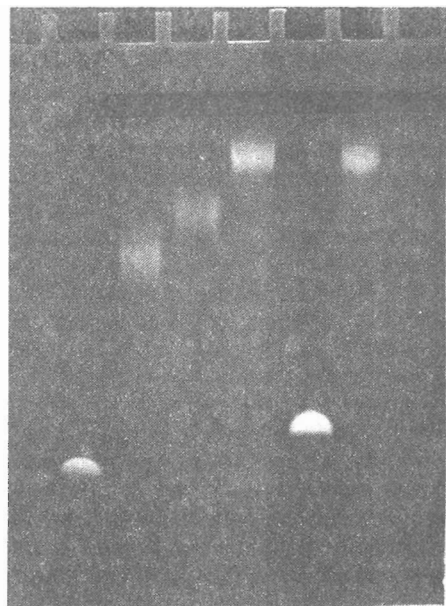


Рис. 1. Электрофорез в 8% ПААГ, содержащем 7 М мочевины, 16-мера d(GGTGGAGGCTCTGTAC) (1), его 3'-конъюгатов с PEG3000 (2), PEG4000 (3), PEG6000 (4) и 22-мера d(TCATGGTCATAGCTGTTTCTG) (5) и его 5'-конъюгата с PEG6000 (6) после удаления защитных групп. Гель прокрашивали этидийбромидом и фотографировали в УФ-свете

XC

ВРВ

1 2 3 4 5 6

Крупномасштабный синтез конъюгатов олигонуклеотидов с PEG целесообразнее всего проводить жидкофазным способом подобно тому, как это описано в работе [7]. В этом случае к олигонуклеотиду присоединяется монометилловый эфир PEG, который играет роль одновременно растворимого полимерного носителя и 3'-фосфатзащитной группы для первого нуклеотидного звена. Однако при использовании PEG с молекулярной массой 5000—6000 этот подход применим только для получения достаточно коротких олигомеров (обычно не более 8—10-звенных), поскольку при удлинении нуклеотидной цепи начинает резко меняться растворимость защищенного конъюгата. Поэтому для синтеза модифицированных 15—20-меров необходимо уже использовать PEG10000—20000 [7].

После окончания наращивания олигонуклеотидной цепи и удаления диметокситритильной группы конъюгаты олигонуклеотидов с PEG отщепляли от носителя действием смеси моноэтаноламин — этанол (1 : 1), при этом одновременно происходило удаление амино- и фосфатзащитных групп [13]. Конъюгаты выделяли электрофорезом в полиакриламидном геле или обращенно-фазовой хроматографией (рис. 1 и 2).

В настоящее время проводятся эксперименты по изучению эффективности проникновения в клетку этих конъюгатов, их стабильности и ингибирования активности на различных культурах клеток и в бесклеточных системах. Полученные нами предварительные результаты полностью согласуются с данными [6] и показывают, что этот тип конъюгированных молекул может быть успешно использован в качестве молекулярных зондов и антисенс-ингибиторов экспрессии генов [14].

Экспериментальная часть

В работе использовали носители на основе стеклянных шариков (long chain alkyl amine controlled pore glass LCAA-CPG, 0,1 ммоль аминогрупп на 1 г, Pierce, США), диметокситритилхлорид (Aldrich, США), полиэтиленгликоль PEG1000, PEG2000, PEG4000 и PEG6000 (Serva, ФРГ), монометилловый эфир PEG5000 (Aldrich, США). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 UF₂₅₄

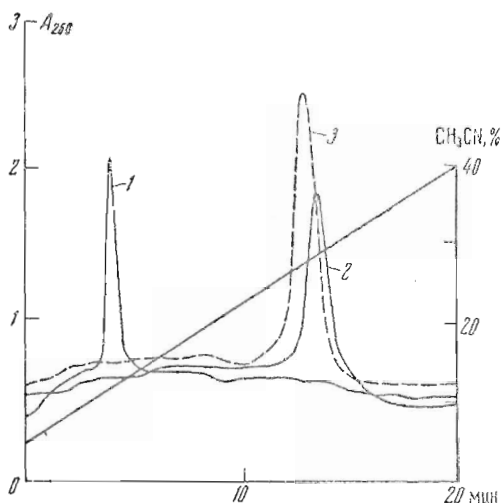


Рис. 2. Обращенно-фазовая жидкостная хроматография в градиенте концентрации ацетонитрила 5—40% в 0,01 М ацетате триэтиламмония реакционных смесей, полученных после удаления защитных групп при синтезе 16-мера d(GGTGGAGGCS'CTGTAC) (1), его 3'-конъюгата с PEG4000 (2) и 5'-конъюгата 22-мера d(CTATGGTCATAGCS'CTGTTCCTG) с PEG6000 (3)

(Merck, ФРГ). Для обессоливания олигонуклеотидов использовали колонки NAP-10 и NAP-25 (Pharmacia, Швеция), соединения элюировали 0,05 М TEAB.

Моно(диметокситритильное) производное полиэтиленгликоля получали действием на 1 ммоль последнего 0,2 ммоль диметокситритилхлорида в пиридине. Компоненты реакции смешивали при охлаждении до 0° С, затем температуру медленно повышали до комнатной. Через 1,5—2 ч (контроль за прохождением реакции осуществляли ТСХ на силикагеле в системе хлороформ — метанол, 20 : 1) к реакционной смеси прибавляли 100 мл 5% раствора гидрокарбоната натрия и продукт реакции экстрагировали хлороформом (3 × 100 мл). Хлороформный слой упаривали в вакууме, остаток растворяли в хлороформе, наносили на колонку с силикагелем и проводили хроматографию в системе хлороформ — метанол. Целевой продукт элюировали с колонки три 5% метанола в смеси. Собранные фракции упаривали в вакууме и остаток высушивали. Выход DMT-PEG составлял 60—85%.

Носитель функционализировали действием избытка фталевого ангидрида в пиридине, как описано в работе [8]. Для этого 1 г LCAA-CPG промывали дважды 10% раствором *N,N*-дизопропилэтиламина в пиридине, пиридином и высушивали упариванием с пиридином в вакууме. Затем прибавляли 850 мкл 1-метилимидазола и 1 г фталевого ангидрида. Реакционную смесь встряхивали 16 ч при комнатной температуре, после чего смолу промывали водным пиридином, пиридином, эфиром и высушивали. Затем к сухому фталированному носителю прибавляли моно(диметокситритильное) производное PEG (0,3 ммоль) в присутствии мезитилсульфония-3-нитро-1,2,4-триазиолида (0,5 ммоль) и 1-метилимидазола (1 ммоль). Реакционную смесь встряхивали 1—2 ч при комнатной температуре, после чего реакцию останавливали прибавлением 0,25 мл этанола. Носитель отделяли фильтрованием, промывали последовательно пиридином, метанолом, эфиром и высушивали в вакууме. Полученный таким образом носитель содержал 5—25 мкмоль остатков PEG на 1 г.

Фосфитамидное производное PEG получали действием 2-цианостил-*N,N*-дизопропиламидохлорфосфита на диметокситритил-PEG по методу [9].

Твердофазный синтез олигодезоксирибонуклеотидов проводили по стандартным программам на синтезаторе фирмы Applied Biosystems, модель 381A (США), в масштабе 1 или 0,2 мкмоль (см. также [10, 11]).

Монометилловый эфир PEG5000 присоединяли к мононуклеотиду аналогично тому, как это описано выше для посадки первого нуклеотидного звена на модифицированный PEG твердый носитель. Выделение моно- и олигонуклеотидов, содержащих остатки PEG, а также наращивание олигонуклеотидной цепи в жидкой фазе проводили на уровне 10—25 мкмоль как описано в работе [7].

Синтетические олигодезоксирибонуклеотиды деблокировали после окончания наращивания цепи как описано ранее [12]. 5'-Концевую диметокситритильную группу удаляли обработкой 1,6% раствором трихлоруксусной кислоты в дихлорметане в течение 1 мин, затем обрабатывали 30 мин смесью моноэтаноламин — MeOH (1:1) при 70° С. Реакционную смесь разбавляли водой до 1 мл и обессоливали.

Конъюгаты олигонуклеотидов с PEG после удаления защитных групп выделяли электрофорезом в 8—10% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. Обращенно-фазовую жидкостную хроматографию проводили на FPLC-хроматографе фирмы Pharmacia (Швеция) на колонке ProRPC-HR 5/10 той же фирмы в 0,01 М триэтиламмоний-ацетатном буфере в градиенте концентрации ацетонитрила 5—40%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Englisch U., Gauss D. H.* // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991. V. 30. P. 613—722.
2. *Ueda T., Tohda H., Chikazumi N., Eckstein F., Watanabe K.* // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. № 3. P. 547—552.
3. *Shea R. G., Marsters J. C., Bischofberger N.* // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. № 13. P. 3777—3783.
4. *Goodson R. J., Katre N. V.* // *Biotechnology.* 1990. V. 8. № 4. P. 343—346.
5. *Amasino R. M.* // *Anal. Biochem.* 1986. V. 152. № 2. P. 304—307.
6. *Erdmann V. A., Bald R., Furste J. P., Hartmann R. K., Lorenz S.* // *Abstracts of the 3rd Swedish-German Workshop «Nucleic Acid Synthesis, Structure and Function», 1992. Uppsala (Sweden).* P. 14.
7. *Bonora G. M., Scremin C. L., Colonna F. P., Garbesi A.* // *Nucleosides and Nucleotides.* 1990. V. 10. № 1—3. P. 269—273.
8. *Efimov V. A., Buryakova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A.* // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. № 23. P. 8369—8387.
9. *McBride L. J., Kiczek A., Beausage S. L., Caruthers M. J.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1986. V. 108. № 8. P. 2040—2048.
10. *Durand M., Chevie K., Chassignol M., Thuong N. T., Maurizot J. C.* // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. № 21. P. 6353—6359.
11. *Froehler B. C., Ng P. G., Matteucci M. D.* // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 13. P. 5399—5407.
12. *Efimov V. A., Buryakova A. A., Dubey I. Y., Polushin N. N.* // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 16. P. 6525—6540.
13. *Polushin N. N., Pashkova I. N., Efimov V. A.* // *Nucl. Acids Symp.* 1991. Ser. № 24. P. 49—50.
14. *Efimov V. A.* // *Abstracts of the 3rd Swedish-German Workshop «Nucleic Acid Synthesis, Structure and Function», 1992. Uppsala (Sweden).* P. 42.

Поступила в редакцию
1.III.1993

*V. A. Efimov, I. N. Pashkova, A. L. Kalinkina,
O. G. Chakhmakhcheva*

SYNTHESIS OF POLYETHYLENE GLYCOL — OLIGONUCLEOTIDE CONJUGATES

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

A simple and fast method for the synthesis of 3'-, 5'-, and 3',5'-PEG-oligonucleotide conjugated molecules has been developed. Synthesis was carried out by a solid-phase procedure using automatic DNA synthesizer, or by the liquid-phase method. The H-phosphonate, phosphoramidite or phosphotriester chemistry were used for the oligonucleotide chain elongation. The regulated oligonucleotide conjugates obtained were used to study the efficiency of their penetration, stability and antisense effect in cell cultures and cell-free lysates.