



УДК 547.963.32.07

**ОЛИГО(2'-О-ТЕТРАГИДРОПИРАНИЛРИБОНУКЛЕОТИДЫ):
ГИБРИДИЗАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА
И УСТОЙЧИВОСТЬ К НУКЛЕАЗАМ**

© 2000 г. М. А. Кузнецова*, Д. В. Пышный, М. Н. Репкова, А. Г. Веньямина#

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

*Новосибирский государственный университет

Поступило в редакцию 07.09.99 г. Принято к печати 20.09.99 г.

Показано, что олиго(2'-О-тетрагидропиранилрибонуклеотиды) и их аналоги, содержащие 3'-3'-межнуклеотидную связь на 3'-конце, проявляют устойчивость к нуклеазам и достаточно высокое сродство к РНК – основной мишени в антисенс-методологии.

Ключевые слова: олиго(2'-О-тетрагидропиранилрибонуклеотиды); терминальная 3'-3'-связь; гибридизационные свойства; устойчивость; нуклеолитическая деградация; антисенс-методология.

В последние годы резко возрос интерес к конструированию и применению в антисенс-методологии модифицированных олигонуклеотидов различных типов, в их числе 2'-О-модифицированных олигорибонуклеотидов [1].

Тетрагидропиранильная группа (Thp) применяется для защиты 2'-гидроксила при синтезе олигорибонуклеотидов среднего размера различными методами [2–4], хотя использование ее в сочетании с кислотолabileй 5'-О-диметокситригидропиранильной группой требует тщательного подбора условий детритилирования. Синтезированные рибоолигомеры зачастую выделяют и хранят в виде их стабильных 2'-О-Thp-производных. Цель данной работы – сравнительное изучение свойств 2'-О-Thp-содержащих олигорибонуклеотидов как потенциальных антисенс-олигонуклеотидов второго поколения.

Олиго(2'-О-тетрагидропиранилрибонуклеотиды) (I) и (II) (таблица) синтезировали твердофазным *H*-фосфонатным методом [4] в колонке с пористым фильтром в масштабе 1–3 мкмоль полимерсвязанного первого нуклеозида со средним выходом на стадию 95% (по (MeO)₂Tg-катиону) и общим выходом 14–18% после двух препаративных ВЭЖХ и осаждения в виде Li⁺-соли. Для синтеза олигонуклеотида (II) использовали связанный с полимером 3'-О-диметокситригидропиранилтимидин (по аналогии с [5, 6]). С целью исследования устойчивости 2'-О-Thp-содержащих олигорибонуклеотидов в условиях хроматографического выде-

ления 5'-³²P-меченый октарибонуклеотид (I) выдерживали 3 ч в 0.1 М КН₂РO₄ (рН 6.5) или 0.05 М ТЕАВ (рН 8.5) при 25 и 37°C. Анализ электрофорезом в 20% денатурирующем ПААГ показал отсутствие продуктов деградации.

Основными критериями при первичном отборе антисенс-олигонуклеотидов являются их устойчивость к нуклеазам и высокое сродство к НК-мишени. Гибридизационные свойства 2'-О-Thp-октамера (I) и его аналогов (II)–(V) изучали на примере термической стабильности их дуплексов с комплементарными фрагментами ДНК и РНК (таблица). Как видно из полученных данных, 2'-О-Thp-октарибонуклеотид (I) проявляет достаточно высокое сродство к РНК-мишени; введение на 3'-конец тимидина, связанного 3'-3'-фосфодиэфирной связью, практически не влияет на гибридизационные свойства 2'-О-Thp-содержащего олигомера.

Для проверки устойчивости к эндонуклеолитической деградации 2'-О-Thp-октарибонуклеотид (I) и его аналог (IV) инкубировали с РНКазой А (КФ 3.1.4.22) (1.2 ед. акт./мл, 10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 37°C) и анализировали методом ионообменной ВЭЖХ. Оказалось, что инкубация с ферментом в течение 8 ч не приводит к деградации 2'-О-Thp-октамера, в то время как его незащищенный рибоаналог (IV) в этих же условиях гидролизуются полностью. Устойчивость 5'-³²P-меченых 2'-О-Thp-октамера (I) и его аналогов (II)–(V) к 3'-экзонуклеазному расщеплению исследовали на примере воздействия фосфодиэстеразы змеиного яда (КФ 3.1.4.1). Необходимо отметить, что кинирование олигомера (II), имеющего на 3'-кон-

Автор для переписки (тел.: (383-2) 39-62-75; факс: (383-2) 33-36-77; e-mail: ven@niboch.nsc.ru).

Температуры плавления дуплексов (°C)*

Олигомер (3' → 5')	(5') UGGAGCUG [4]	(5') TGGAGCTG [8]
A ^{Thp} C ^{Thp} C ^{Thp} U ^{Thp} C ^{Thp} G ^{Thp} A ^{Thp} C ^{Thp} (I)	41	19
T ^o A ^{Thp} C ^{Thp} C ^{Thp} U ^{Thp} C ^{Thp} G ^{Thp} A ^{Thp} C ^{Thp} (II)	40	16
A ^m C ^m C ^m U ^m C ^m G ^m A ^m C ^m (III) [7]	50	20
ACCUCGAC (IV) [4]	55	38
d(ACCTCGAC) (V) [8]	43	41

* T^o – тимидин, присоединенный 3'-3'-связью. Концентрация олигонуклеотидов 1.3×10^{-5} М; 0.1 М NaCl, 10 мМ какодилат Na, 1 мМ EDTA, pH 7.4.

це присоединенный 3'-3'-связью тимидин, приводит к двум 5'-³²P-меченым продуктам. Продукт (IIa) с меньшей электрофоретической подвижностью соответствует, очевидно, олигомеру, содержащему радиоактивный фосфат на одном из 5'-концов; продукт (IIб) с большей подвижностью – олигонуклеотиду, несущему два ³²P-меченых концевых 5'-фосфата. Как видно из кинетических кривых (рис. 1), 2'-O-Трп-октамер (I) гидролизуется фосфодиэстеразой заметно медленнее, чем его 2'-O-метилрибо- (III), рибо- (IV) и дезоксирибо- (V) аналоги. Олигомеры (IIa) и (IIб) были устойчивы к действию фосфодиэстеразы змеиного яда.

Мы исследовали также поведение 5'-³²P-меченых 2'-O-Трп-олигорибонуклеотида (I) и его аналогов (II)–(IV) в культуральной среде RPMI-1640 (НИИ молекулярной биологии ГНЦ вирусологии и биотехнологии “Вектор” МЗ РФ), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку (ICN, США), прогретую 1 ч при 56°C (рис. 2). Интересно отметить, что наличие в сыворотке фосфатазной активности, проявляющейся при длительной инкубации, приводит к тому, что в случае олигомера (IIб) с двумя 5'-фосфатами мы наблюдали образование наряду с неорганическим фосфатом также и монофосфорилированного олигомера (IIa) (рис. 2, 15). 2'-O-Трп-октамер (I) в этой тест-системе оказался стабильнее его 2'-O-метилрибо- (III) и рибо- (IV) аналогов, а аналог (II) с терминальной 3'-3'-связью был устойчив при инкубации в течение нескольких суток. Это позволяет сделать вывод о том, что минимальная дополнительная модификация 2'-O-Трп-олигорибонуклеотида – введение 3'-терминальной “инвертированной” межнуклеотидной связи – делает его полностью устойчивым к нуклеолитическому расщеплению.

Таким образом, мы показали, что олигорибонуклеотиды, содержащие 2'-O-тетрагидропиранильную группу, проявляют устойчивость к нуклеазам и достаточно высокое сродство к РНК – основной мишени в антисенс-методологии.

Работа выполнялась при поддержке подпрограммы “Новейшие методы биоинженерии” ФЦНТП, а также гранта Министерства образования РФ “Фундаментальные исследования в области химических технологий”.

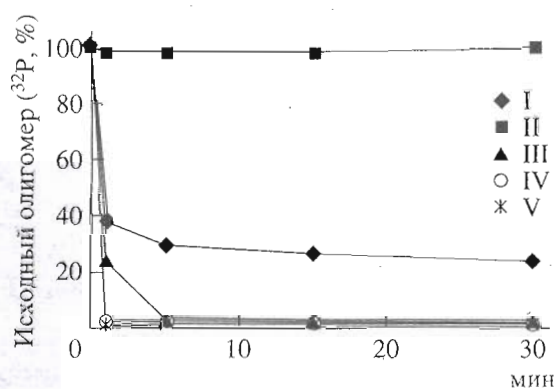


Рис. 1. Кинетические кривые деградации олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда (0.01 ед. акт./мл, 10 мМ Трис-НСl, pH 7.8, 0.5 мМ MgCl₂, 37°C). Концентрация олигонуклеотидов 10^{-5} М.

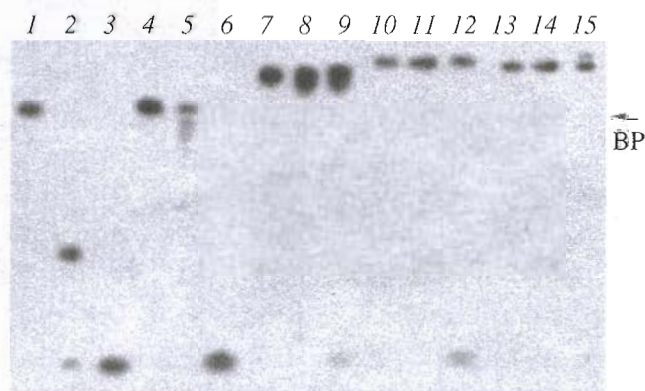


Рис. 2. Электрофоретический анализ олигонуклеотидов (IV) (1–3), (III) (4–6), (I) (7–9), (IIa) (10–12) и (IIb) (13–15), инкубированных при 37°C в культуральной среде, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку; 1, 4, 7, 10, 13 – до инкубации; 2, 5, 8, 11, 14 – инкубация 3 ч; 3, 6, 9, 12 – инкубация 5 сут; 15 – инкубация 3 сут. Концентрация олигонуклеотидов 10^{-5} М. BP – бромфеноловый синий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seeberger P.H., Caruthers M.H. // Applied Antisense Oligonucleotide Technology / Eds C.A. Stein, A.M. Krieg. N.Y.: J. Wiley and Sons, Inc., 1998. P. 51–71.
2. Beaucage S.L., Iyer R.P. // Tetrahedron. 1992. V. 48. P. 2223–2311.
3. Венямина А.Г., Косолапова З.А., Левина А.С. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. С. 125–127.
4. Венямина А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. С. 941–950.
5. Seliger H., Fröhlich A., Montenarh M., Ramalho Ortigão J.F., Rösch H. // Nucleosides Nucleotides. 1991. V. 10. P. 469–477.
6. Boutorine A.S., Venyaminova A.G., Repkova M.N., Sergeeva Z.A., Pyshnyi D.V. // Biochimie. 1994. V. 76. P. 23–32.
7. Косолапова З.А., Венямина А.Г., Репкова М.Н. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. С. 635–642.
8. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биооргани. химия. 1983. Т. 9. С. 516–521.

Hybridization Properties and Nuclease Resistance of Oligo(2'-O-tetrahydropyranylribonucleotides)

M. A. Kuznetsova**, D. V. Pyshnyi*, M. N. Repkova*, and A. G. Venyaminova**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Oligo(2'-tetrahydropyranylribonucleotides) and their analogues containing a 3'-3'-internucleotide bond at the 3'-terminus are nuclease-resistant and possess rather high affinity toward RNA, the main target in the antisense approach.

Key words: antisense approach, hybridization properties, nucleolytic degradation, oligo(2'-tetrahydropyranylribonucleotides), terminal 3'-3'-bond

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (383-2) 39-6275; fax: +7 (383-2) 33-3677; e-mail: ven@niboch.nsc.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.

Сдано в набор 01.10.99 г.

Подписано к печати 06.12.99 г.

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Офсетная печать

Усл. печ. л. 10.0

Усл. кр.-отт. 2.7 тыс.

Уч.-изд. л. 10.6

Бум. л. 5.0

Тираж 255 экз.

Зак. 3204

Свидетельство о регистрации № 0110214 от 08.02.93 г. в Министерстве печати и информации Российской Федерации
Учредители: Российская академия наук, Отделение биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений РАН, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Адрес издателя: 117864, Москва, Профсоюзная ул., 90

Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099, Москва, Шубинский пер., 6