

УДК 577.113.(7 + 4): 547.327

Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот

М. С. Купрюшкин, Д. В. Пышный, Д. А. Стеценко*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

*E-mail: dast@niboch.nsc.ru

Поступило в редакцию 28.09.2014

РЕФЕРАТ Описан новый класс аналогов нуклеиновых кислот, содержащих фосфорилгуанидиновую группу. Окисление связанного с полимерным носителем динуклеозид- β -цианэтилфосфита йодом в присутствии 1,1,3,3-тетраметилгуанидина приводит к образованию динуклеотида, содержащего незаряженную тетраметилфосфорилгуанидиновую группу (Tmg), в качестве основного продукта. Tmg-группа устойчива в условиях твердофазного олигонуклеотидного синтеза, последующего удаления защитных групп и отщепления олигонуклеотида от полимерного носителя аммонолизом. Олигонуклеотиды, содержащие Tmg-группу, способны связываться с комплементарными последовательностями ДНК и РНК со средством, лишь незначительно отличающимся от средства природных олигодезоксирибонуклеотидов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аналоги нуклеиновых кислот, модифицированный олигонуклеотид, твердофазный синтез, тетраметилгуанидин, фосфорилгуанидин, фосфит.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ MALDI-TOF – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с последующим применением времяпролетного масс-анализатора; ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; TMG – 1,1,3,3-тетраметилгуанидин.

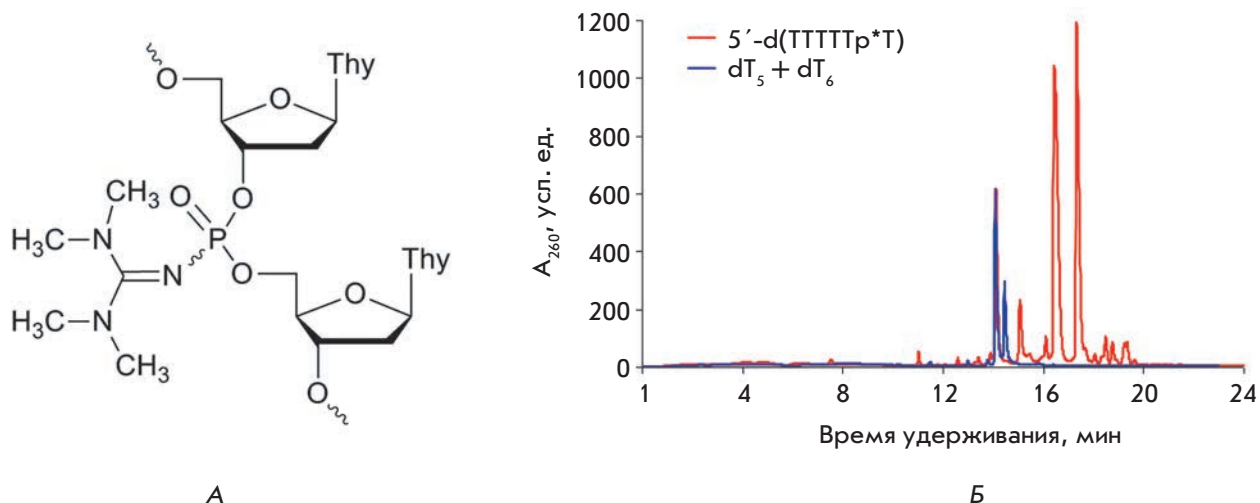
Аналоги нуклеиновых кислот различной структуры широко используются в молекулярно-биологических исследованиях, а также рассматриваются в качестве перспективных терапевтических средств и зондов для молекулярной диагностики [1, 2]. Однако в настоящее время главным препятствием, сдерживающим широкое внедрение производных нуклеиновых кислот, является недостаточное проникновение олигонуклеотидов в клетки в отсутствие особых трансфекционных агентов или доставочных платформ. Считается, что одна из основных причин неэффективного проникновения олигонуклеотидных производных в клетку – их большой суммарный отрицательный заряд.

За последние 20 лет относительно хорошо были изучены только два типа аналогов нуклеиновых кислот с формально электронейтральным остовом – пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) [3] и фосфордиамидные морфолиноолигонуклеотиды (PMO) [4]. Аналоги обоих типов способны к комплементарному связыванию с природными молекулами ДНК и РНК, и в силу этого они нашли применение как в молекулярной биологии, так и, в особенности, в медицине в качестве потенциальных лекарственных препаратов [5, 6]. Таким образом, поиск новых аналогов нуклеиновых кислот, на основе которых возможна разработка олигонуклеотидных терапевтических

средств, способных эффективно проникать в клетки в отсутствие трансфекционных агентов или иных средств доставки, остается весьма актуальной задачей.

Мы показали, что окисление 3',5'-дитимидин- β -цианэтилфосфита йодом в пиридине в присутствии 1,1,3,3-тетраметилгуанидина (TMG) приводит к образованию динуклеотида с межнуклеотидной тетраметилфосфорилгуанидиновой группой (Tmg) в качестве основного продукта (*рисунком А*) (аналогично, окисление триалкилфосфитов йодом в пиридине в присутствии первичного амина приводит к образованию фосфорамидов [7]). Твердофазный олигонуклеотидный синтез был продолжен до получения гексатимидилата. Олигонуклеотид отщепляли от полимера 25% водным раствором аммиака при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего аммиак удаляли в вакууме, и раствор, содержащий олигонуклеотид, анализировали при помощи ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрии MALDI-TOF.

На профиле элюции реакционной смеси (*рисунком Б*) видно, что основным продуктом является олигонуклеотид 5'-d(T₃p*Т), где p* обозначает положение Tmg-группы. Модифицированному олигонуклеотиду соответствуют два пика с τ_R 16.7 и 17.6 мин, которые можно отнести к отдельным диастереомерам в силу хиральности межнуклеотидной фос-



А – структура олигонуклеотида с межнуклеотидной тетраметилфосфорилгуанидиновой группой (Тmg). Б – профиль элюции олигонуклеотида 5'-d(T₅p*T), где p* – положение Тmg-группы. ОФ-ВЭЖХ проводили на хроматографе Agilent 1200 (США), используя колонку Zorbax SB-C18 (5 мкм) 4.6 × 150 мм в градиенте ацетонитрила (0 → 40%) в 20 мМ ацетате триэтиламмония, рН 7 в течение 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин

форилгуанидиновой группы. В качестве побочного продукта присутствует также немодифицированный олигонуклеотид dT₆ с τ_R 14.3 мин, который, вероятно, образуется в результате гидролиза промежуточного реакционноспособного йодфосфониевого производного следами влаги. Следует отметить выраженный гидрофобный характер Тmg-группы, проявляющийся в увеличении времени удерживания τ_R олигонуклеотида с Тmg-группой по сравнению со временем удерживания немодифицированного олигонуклеотида. Были синтезированы модифицированные олиготимидилаты длиной до 20 нуклеотидов с одной

или двумя Тmg-группами в разных положениях олигонуклеотидной цепи. Наличие тетраметилфосфорилгуанидиновых групп в составе олигонуклеотидов подтверждено данными масс-спектрометрии MALDI-TOF (таблица).

Эксперименты по термической денатурации с оптической регистрацией сигнала при концентрации каждого олигонуклеотида 10⁻⁵ М в 10 мМ Na-какодилатном буфере рН 7.2, содержащем 100 мМ NaCl и 5 мМ MgCl₂, выявили относительно незначительное влияние изолированной Тmg-группы на 3'-конце и в середине цепи

Структура и молекулярные массы фосфорилгуанидиновых производных олигонуклеотидов, содержащих Тmg-группу

№	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'	Молекулярная масса [#]		
		расчет [М]	эксперимент	
			[М + Н] ⁺	[М - Н] ⁻
1	d(TTTTTp*T)	1860.39	1860.35	1857.54
2	d(Tp*TTTTT)	1860.39	1860.34	1858.63
3	d(TCp*A)	941.80	942.17	938.97
4	d(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTp*T)	6119.16	6121.13	6113.80
5	d(TTTTTTTTTTTTTp*TTTTTTTTT)	6119.16	6121.54	–
6	d(TTp*TTTTTTTTTTTTTTTTTTT)	6119.16	6120.01	6114.19
7	d(TTp*TTTTTTTTTTTTTTTTTTTp*T)	6216.33	–	6221.11

p* – положение Тmg-группы.

[#]Спектры MALDI-TOF регистрировали на приборе Bruker Reflex III Autoflex Speed (Германия) в варианте положительных или отрицательных ионов с использованием 3-гидроксипиколиновой кислоты в качестве матрицы.

на стабильность комплементарного комплекса, образованного модифицированными олигодезоксирибонуклеотидами с матрицами поли(dA) и поли(rA) по сравнению с контрольным олигонуклеотидом dT₂₀. Температуры плавления (T_m) комплексов на матрице поли(rA) составили 48°C для 5'-d(T₁₉p*Т) и 46.5°C для 5'-d(T₁₁p*Т₉), 54 и 52.5°C на матрице поли(dA) соответственно, что достаточно близко к T_m комплексов, образованных олигонуклеотидом dT₂₀ на тех же матрицах – 48 и 55°C соответственно. Индивидуальные диастереомеры d(T₁₉p*Т), которые смогли разделить при помощи ОФ-ВЭЖХ, на матрице dC₂A₂₀C₂ показали незначительно различающиеся значения T_m – 45.8°C у диастереомера с меньшим временем удерживания и 45.1°C у диастереомера с большим временем удерживания по сравнению с 45°C у немодифицированного олигонуклеотида dT₂₀. Комплекс олигонуклеотида с модификацией в середине цепи d(T₁₁p*Т₉), полученного в виде смеси диастереомеров, плавился при 44.7°C. Эти результаты тем более неожиданные, поскольку при замещении межнуклеотидного фосфата тетраметилфосфорилгуанидиновой группой на место одного атома кислорода входит группировка из 20 атомов (считая и атомы водорода). Полученные данные свидетельствуют, что модифицированные Tmg-группами олигодезоксирибонуклеотиды могут образовывать устойчивые комплементарные комплексы с ДНК и РНК, лишь незначительно отличающиеся по своей термической стабильности от нативных, что, в частности, необходимо для проявления терапевтической активности.

Таким образом, нами описан новый класс фосфорилгуанидиновых аналогов нуклеиновых кислот [8], третий в мировой практике класс формально электронейтральных производных олигонуклеотидов наряду с уже известными пептидными нуклеиновыми кислотами и морфолиновыми олигомерами. Полученные результаты свидетельствуют, что окисление межнуклеотидного фосфита йодом в пиридине в присутствии 1,1,3,3-тетраметилгуанидина может служить удобным методом получения производных олигонуклеотидов с тетраметилфос-

форилгуанидиновой (Tmg) группой. Важно отметить, что, в отличие от предложенных ранее олигонуклеотидных аналогов, а именно РНА и РМО, синтез фосфорилгуанидиновых производных можно проводить в рамках обычной амидофосфитной химии с использованием стандартного синтезатора ДНК. Появляется возможность получения разнообразных фосфорилгуанидиновых олигомеров с использованием широкого спектра коммерчески доступных амидофосфитных мономеров, включая модифицированные по углеводным остаткам и гетероциклическим основаниям.

Показано, что Tmg-группа устойчива в условиях твердофазного олигонуклеотидного синтеза, последующего удаления защитных групп и отщепления от полимерного носителя гетерогенных олигодезоксирибонуклеотидов при помощи 25% водного раствора аммиака в течение 16 ч при 55°C. Олигонуклеотиды, содержащие одну или несколько Tmg-групп, связываются с комплементарными последовательностями ДНК и РНК со сродством, лишь незначительно отличающимся от сродства природных олигодезоксирибонуклеотидов, несмотря на пространственно-затрудненный характер Tmg-группы. Полученные результаты, по нашему мнению, свидетельствуют о возможности использования нового класса фосфорилгуанидиновых аналогов нуклеиновых кислот для создания новых биологически активных производных олигонуклеотидов. ●

Авторы выражают благодарность М. Касакину за помощь в регистрации масс-спектров и А. Ломзову за проведение экспериментов по термической денатурации.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Правительства Российской Федерации для научных проектов, выполненных под руководством ведущих мировых ученых (соглашение № 14.В25.31.0028 с С. Альтманом как ведущим ученым), и гранта РФФИ № 13-04-01176.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Therapeutic Oligonucleotides: Methods and Protocols. Methods Mol. Biol. / Ed. Goodchild J. N.Y.: Humana Press, 2011. V. 764. 340 p.
2. Bell N.M., Micklefield J. // ChemBioChem. 2009. V. 10. № 17. P. 2691–2703.
3. Egholm M., Buchardt O., Nielsen P.E., Berg R.H. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. № 5. P. 1895–1897.
4. Summerton J., Weller D. // Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997. V. 7. № 3. P. 187–195.
5. Nielsen P.E. // Mol. Biotechnol. 2004. V. 26. № 3. P. 233–248.
6. Karkare S., Bhatnagar D. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 71. № 5. P. 575–586.
7. Jäger A., Levy M.J., Hecht S.M. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 19. P. 7237–7246.
8. Стеценко Д.А., Купрюшкин М.С., Пышный Д.В. Заявка на ВО патент РСТ/RU2014/000647, приоритет от 22.08.2014.