

Универсальный способ получения конъюгатов

терапевтических олигонуклеотидов с биологически активными лигандами

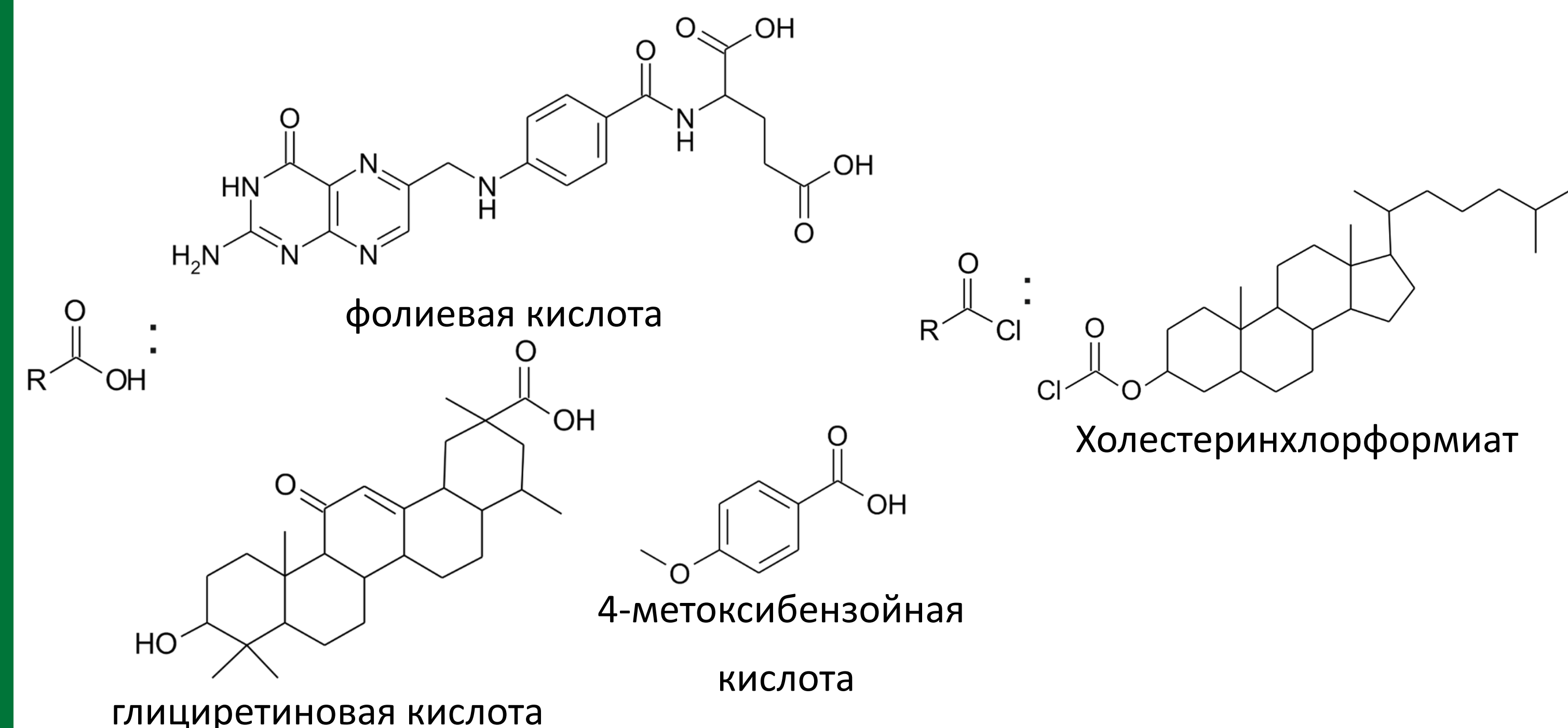
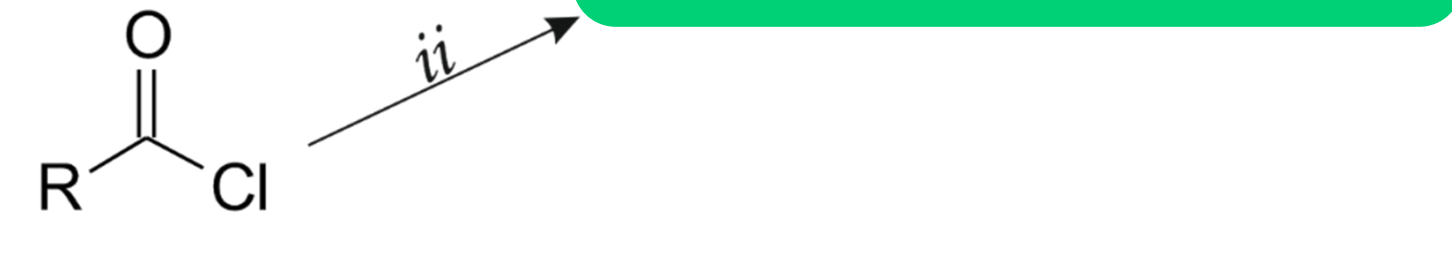
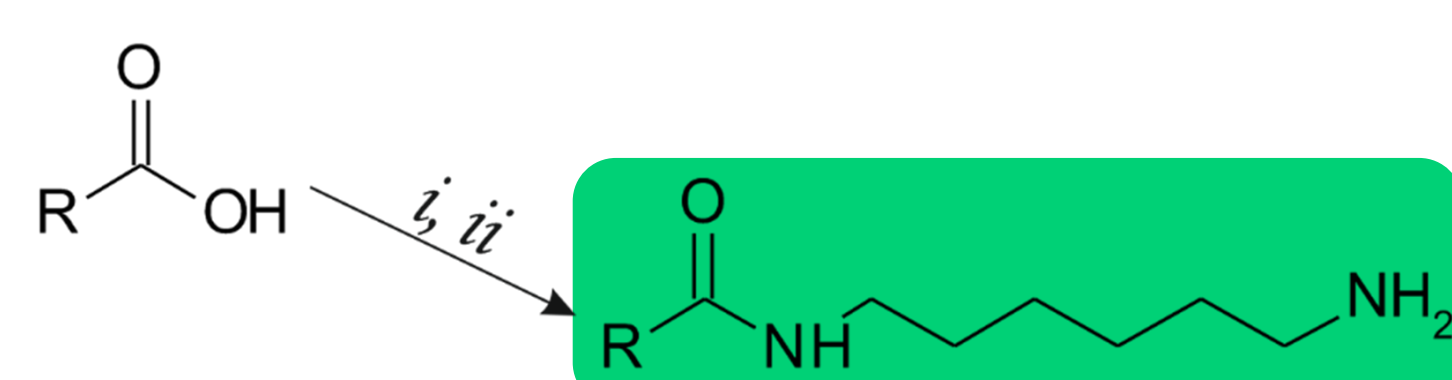
Махалова К.И., Черноловская Е.Л., Венямина А.Г., Мещанинова М.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

В настоящее время конъюгирование нуклеиновых кислот (НК) с низкомолекулярными биологически активными лигандами является перспективной основой для создания высокоэффективных средств диагностики и терапии для лечения вирусных, онкологических и других заболеваний. Учитывая большое разнообразие лигандов, разработка универсальных и эффективных методов синтеза конъюгатов НК является актуальной задачей.

В представленной работе в качестве низкомолекулярных лигандов были выбраны молекулы, обладающие комплексом потенциальных терапевтических свойств в сочетании со способностью улучшать доставку НК в клетки. Глицирретиновая кислота — тритерпен, обладающий широким спектром фармакотерапевтических свойств, включая антиоксидантные, противовоспалительные, противовирусные и противораковые свойства. Как известно, на поверхности клеток печени имеется большое количество рецепторов к глицирретиновой кислоте, поэтому данная кислота и ее производные широко используются в системах доставки. Фолиевая кислота, известная как витамин B9, принимает участие во многих метаболических процессах организма. Фолиевая кислота имеет очень высокое сродство к своим рецепторам, которые гиперэкспрессируются на поверхности раковых клеток, при этом рецептор эффективно поглощается клеткой при связывании им агента, содержащего фолиевую кислоту, что позволяет использовать фолаты в качестве агентов-доставщиков. 4-Метоксибензойная кислота обладает высокой аффинностью к сигма-рецепторам, которые сверхэкспрессируются на поверхности раковых клеток при некоторых типах рака. Введение остатка холестерина в НК увеличивает эффективность ее проникновения в клетки за счет взаимодействия с гидрофобной частью клеточной мембраны. *N*-Ацетилгалактозамин (GalNAc) используется в качестве «нацеливающего» лиганда на асиалогликопротеиновые рецепторы.

Предварительно были получены производные глицирретиновой, фолиевой, 4-метоксибензойной кислот и холестерина, содержащие гексаметилендиаминовый линкер. Для этого была проведена активация карбоксильной группы кислот *N*-гидроксисукцинимидом в присутствии дициклогексилкарбодиимида, с последующим взаимодействием с гексаметилендиамином.

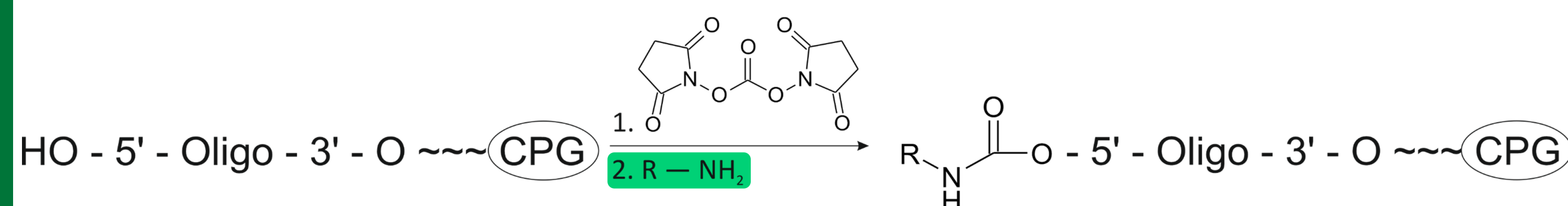


i — дициклогексилкарбодиимид, *N*-гидроксисукцинимид

ii — гексаметилендиамин, триэтиламин

Выходы после хроматографического выделения на силикагеле составили 67%, 37% и 72% для аминопроизводных глицирретиновой, фолиевой, 4-метоксибензойной кислот соответственно.

В качестве эффективного и удобного метода синтеза конъюгатов олигонуклеотидов был использован разработанный в нашей лаборатории новый вариант твердофазного метода синтеза [1].



Oligo: 5'-GGCUU^mGAC^mAAGUU^mGU^mAU^mAU^mGG-3'

5'-G^mG^mC^mU^mU^mG^mA^fC^mA^fG^fU^mU^mG^mU^mA^mU^mA^mU^mG^mG^m-3'

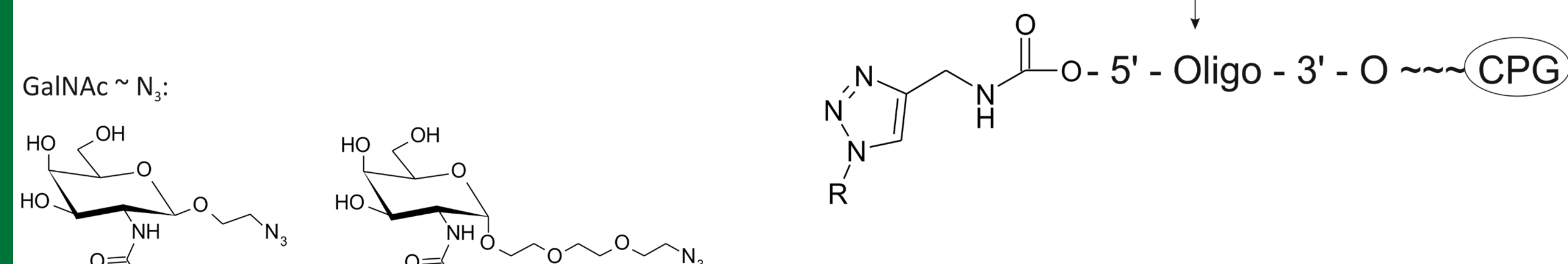
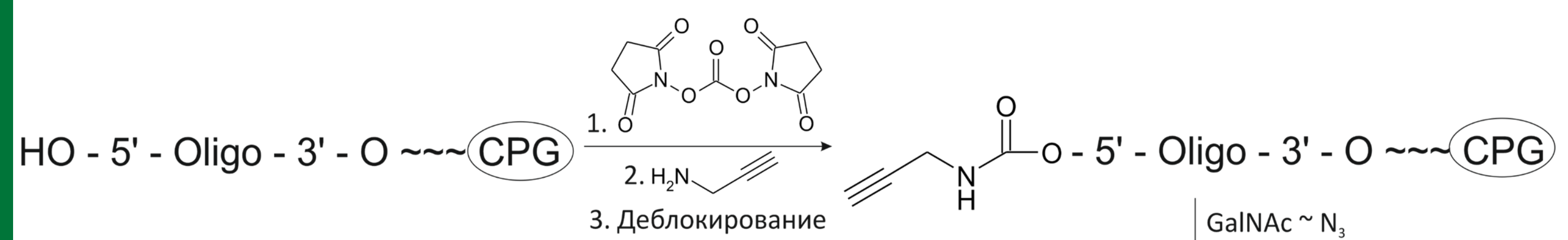
N — рибонуклеотиды

N^m — 2'-O-метилированные рибонуклеотиды

N^f — 2'-фтор нуклеотиды

Путем активации свободной 5'-гидроксильной группы защищенного полимерсвязанного олигонуклеотида с помощью *N,N'*-дисукцинимидилкарбоната с последующим взаимодействием с полученными ранее аминосодержащими производными кислот, были синтезированы новые конъюгаты олигонуклеотида с глицирретиновой, фолиевой, 4-метоксибензойной кислотами и холестерином.

Данный метод также позволяет вводить в олигонуклеотид группировки, позволяющие дальнейшее биоконъюгирование НК. Так, например, методом медь-катализируемого циклоприсоединения в растворе (метод «клик»-химии) между азидом *N*-ацетилгалактозамина и олигонуклеотидом, модифицированным по 5'-положению введением пропаргиламина, были получены α - и β -GalNAc-производные олигонуклеотида, отличающиеся строением линкера.



Азидопроизводные *N*-ацетилгалактозамина

В представленной работе в качестве функциональной НК была выбрана малая интерферирующая РНК (siРНК) к гену MDR1 (ген множественной лекарственной устойчивости), кодирующему мембранный белок Р-гликопротеин, отвечающий за перенос многих веществ через мембрану клетки, тем самым регулируя чувствительность организма к лекарственным препаратам. siРНК являются медиаторами процесса РНК-интерференции — природного механизма, в ходе которого происходит специфическая деградация мРНК гена-мишени. Известно, что химически синтезированные короткие двуцепочечные олигорибонуклеотиды длиной 21-23 нуклеотида, имитирующие природные siРНК, являются эффективными агентами для направленного подавления экспрессии генов. Получены 5'-конъюгаты сенс цепи анти MDR1 siРНК. Для повышения их устойчивости в биологических средах использовали два варианта модификаций: 1) введение 2'-O-метилированных остатков рибозы в нуклеозочувствительные сайты [2], 2) полная модификация 2'-O-метил/2'-фтор нуклеотидами.

Полученные результаты подтверждают универсальность предложенного подхода к синтезу олигонуклеотидных конъюгатов, который может быть использован для синтеза конъюгатов терапевтических нуклеиновых кислот с группировками различного типа действия в зависимости от конкретной исследовательской задачи.

[1] Meschaninova et.al, Molecules, 2019, 24, 4266.

[2] Volkov et.al, Oligonucleotides, 2009, 19, 191.