

ХИМИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 547.963.32.057:542.95

**СИНТЕЗ АНТИСЕНСОВЫХ
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДТИОФОСФАТОВ
ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА БАКТЕРИЙ *M. SMEGMATIS***

В. Г. Метелев, Т. С. Орещкая

(кафедра химии природных соединений)

Синтезирована серия антисенсовых олигодезоксирибонуклеозидтиофосфатов, предназначенных для проведения исследований по ингибированию ими роста лекарственно-устойчивых штаммов бактерий *Micobacterium smegmatis* in vitro.

Современный уровень развития синтеза модифицированных олиго- и полинуклеотидов на автоматических ДНК-синтезаторах, а также успешные эксперименты по подавлению репликации и экспрессии ряда вирусов с помощью антисенсовых олигонуклеотидов *in vitro* и *in vivo* (см. примеры в обзорах [1, 2]) позволяют рассматривать последние как потенциально новый класс терапевтических реагентов. Под понятием «антисенсовый (антисмысловый) олигонуклеотид» обычно подразумевается синтетическая односпиральная нуклеиновая кислота, состоящая из 15–30 мононуклеотидных звеньев, способная привести к подавлению синтеза белка за счет связывания с определенным комплементарным ей (смысловым) участком мРНК через спаривание по типу Уотсона–Крика. Именно сиквенс-специфическое узнавание целевых нуклеиновых кислот-мишеней синтетическими олигонуклеотидами открывает путь к созданию новых подходов в фармакологии.

Несмотря на большое количество публикаций в последние годы по синтезу модифицированных антисенсовых олигонуклеотидов и изучению их активности *in vitro* и *in vivo*, антисенсовая технология разработана слабо. Практически каждое ее звено (синтез и очистка модифицированных полинуклеотидов в препаративных и сверхпрепаративных масштабах, проникновение через клеточные стенки и мембраны, устойчивость к действию ферментов внутри клеток, высокая специфичность взаимодействия антисмыслового полинуклеотида с целевой нуклеиновой кислотой, его токсичность и т.д.) требует дальнейшего развития. Особое внимание необходимо при разработке антисенсовой технологии в применении к бактериям: полинуклеотиды в обычных условиях не способны проникнуть внутрь бактерий из-за особенности «архитектуры» стенок бактериальных клеток, особенно внешнего слоя, который не пропускает гидрофильных соединений. Создание новых противобактериальных лекарств является крайне важной задачей: если раньше с бактериальными инфекциями боролись с помощью дешевых, легкодоступных

и эффективных бактериальных препаратов, то сейчас из-за приобретения бактериями устойчивости ко многим лекарственным препаратам эта проблема возникла вновь.

В настоящей работе проведен синтез серии антисенсовых олигодезоксирибонуклеозидтиофосфатов (ОТФ), предназначенных для проведения исследований по ингибированию ими роста лекарственно-устойчивых штаммов бактерий *M. smegmatis* (как упрощенной модели *Micobacterium tuberculosis* [3]) *in vitro* (таблица).

Выбор нуклеотидных последовательностей антисенсовых олигонуклеотидов был сделан на основе анализа известных первичных структур целевых мРНК-мишеней, вторичных структур выбранных для исследования участков РНК и ОТФ, сравнения на совпадение выбранных для синтеза нуклеотидных последовательностей с таковыми из банка данных нуклеиновых кислот [4] и других факторов.

Синтез ОТФ осуществляли на автоматических синтезаторах «Biosearch» (модель 8700) гидрофосфорильным или амидофосфитным методами в масштабе 1–10 мкмоль и «Applied Biosystems» (380 В) амидофосфитным методом в масштабе 1 мкмоль. В некоторых случаях стандартные методики были изменены с целью увеличения выходов модифицированных олигонуклеотидов. Введение тиофосфатных связей при амидофосфитном методе осуществляли постадийным окислением образующегося межнуклеотидного фосфита 1%-м раствором 3Н-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида в ацетонитриле, как описано в работе [5], или постсинтетическим одностадийным окислением межнуклеотидных Н-фосфонатов свежеприготовленной смесью серы S₈ (0.25 г), сероуглерода (2.4 мл), пиридина (2.4 мл) и триэтиламина (0.2 мл) [6] в гидрофосфорильном подходе. После удаления защитных групп с гетероциклических оснований и межнуклеотидных фосфатов аммиачной обработкой в течение 16 ч при 55° или 3 дней при комнатной температуре целевой олигонуклеотид выделяли обращенно-фазовой хроматографией на C₁₈-носителях с использованием градиента ацетонитрила. Удаление

метокситритильных защитных групп проводили с помощью 80%-й уксусной кислоты в течение 30 мин, после чего олигонуклеотиды высаживали 95%-м этанолом и диализовали в диализных мешочках *Spectra/Por 6 Membrane MWCO: 3500 (Spectrum)*. Олигонуклеотиды переводили в натриевые соли, пропуская их через *Dowex (Na⁺)* или высаживая 2%-м раствором перхлората натрия в ацетоне. Как показали эксперименты, синтез ОТФ с длиной олигонуклеотидной цепи более 20 звеньев лучше проводить амидофосфитным методом, при котором выше выходы на стадии конденсации, чище реакционная смесь и исключено использование сероуглерода.

В ходе предварительных экспериментов, проведенных Э. Рапапортом в Вустерском центре биомедицинских исследований (США), по ингибированию роста бактерий *M. smegmatis* *in vitro* синтетическими олигонуклеотидами не было обнаружено никакой активности. Даже при концентрации ОТФ 25 мкМ подавление роста бактерий не наблюдалось. ОТФ с ковалентно присоединенными гидрофобными группами, например стеариновой или диметокситритильной (олигонуклеотид 5, таблица), которые успешно используются для повышения эффективности антисенсовых олигонуклеотидов в других системах [7], и ОТФ, модифицированные по межнуклеотидным фосфа-

там, в том числе содержащие метилфосфонатные, метокситриламидные, бутиламидные (4–6 в таблице, где буквой «m» отмечено положение модификации) и другие межнуклеотидные связи, не проявляли противобактериальной активности.

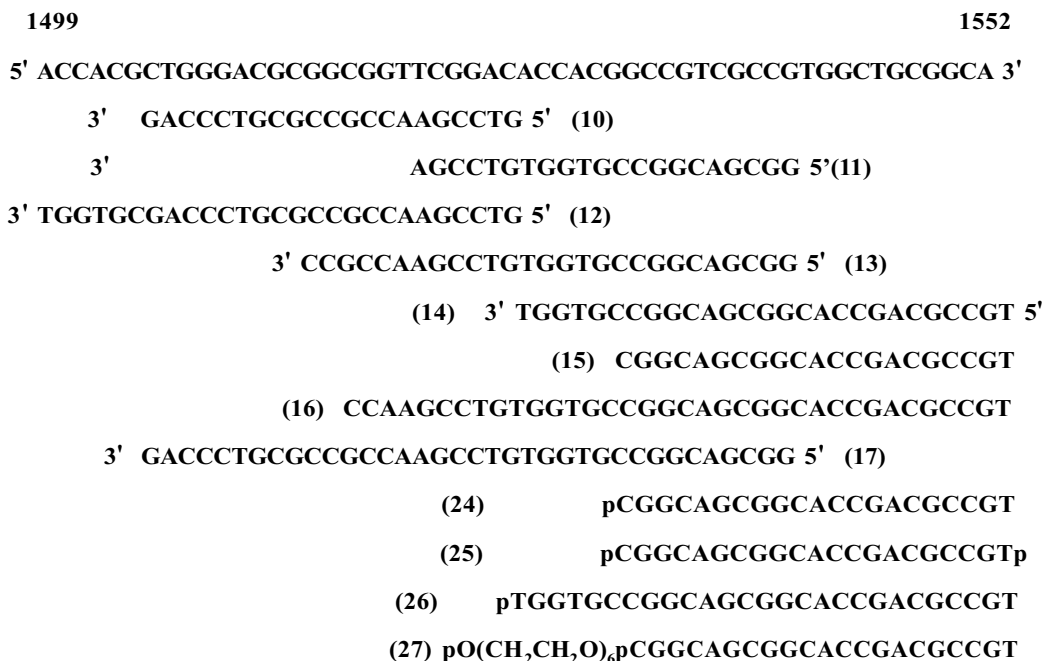
Подавления роста бактериальных клеток удалось добиться с помощью антисенсовых ОТФ при использовании их совместно с этамбутолом, действие которого связано с изменением структуры стенок бактерий. Из всех испытанных олигонуклеотидов в присутствии этамбутола в концентрациях 0.5–5 мкг/мл активность проявляли лишь олигонуклеотиды, комплементарные области 1499–1552 из *ask-asd* оперона. Нуклеотидная последовательность этой области является высококонсервативной среди микобактерий и других бактерий и, как предполагается, кодирует активный центр аспартат киназы [8]. *Ask-* и *asd-*белки катализируют биосинтетические реакции, которые влияют на целостность клеточных стенок микобактерий. Учитывая эти факты, мы синтезировали восемь ОТФ, комплементарно перекрывающих эту область (схема и таблица).

Олигонуклеотиды 10–12 в сочетании с этамбутолом практически не проявляли ингибирующего эффекта (10–20%). Наиболее активными оказались ОТФ 14–16: при концентрации этамбутола 0.5–5 мкг/мл они приводили к

Антисенсовый олигодезоксирибонуклеозидтрифосфат*	Мишень	Комплементарный участок гена
1. АТТСТСГТАГТСАССССААТТГГАСАТ 2. САТСТСТСТССТСГАТГ	<i>M. smegmatis</i> , мРНК L-лактат-2-монооксигеназы	875–901 860–877
3. АГСТСТСГАТТСТГТТГСТГТГГТСАТ 4. АГСТСТСГАТТСТГТТГСТГТГГТСА(m)Т 5. ТrАГСТСТСГАТТСТГТТГСТГТГГТСА(m)Т 6. ССТАГТГТАССТГГСГААСГААТСА(m)Т 7. САТСТСТСТССТСГАТГ	<i>M. smegmatis</i> , <i>gltA</i> мРНК цитрат синтазы	313–339 контроль 294–311
8. АГТГТАТССАТТТСССАТСТСТС 9. ГТААГТАТССАТТТСССТТСТС	<i>Bacillus sp.</i> , мРНК аминотрансферазы D-аминокислот	140–166 контроль
10. ГТССГААССГССГТССАГ 11. ГГСГАССГССГТГТССАГ 12. ГТССГААССГССГТССАГСГТГГТ 13. ГГСГАССГССГТГТССААССГСС 14. ТГССГАССАССГССАССГССГТГГТ 15. ТГССГАССАССГССАССГСС 16. ТГССГАССАССГССАССГССГТГТССААСС 17. ГГСГАССГССГТГТССААССГССГТССААСС 18. ГАТГССГТСТТССАТГССГТГТСТСТС 19. ТАСТССГТСАГГАТГССГТСТТССАТ	<i>M. smegmatis</i> , оперон аспартат киназы и аспартат полуальдегид дегидрогеназы (<i>ask-alpha</i> , <i>ask-beta</i> , <i>asd</i>)	1505–1525 1520–1540 1499–1525 1514–1540 1526–1552 1532–1552 1505–1540 1517–1552 1795–1822 1808–1834
20. ТГССГТГССАТГТСТТСА 21. СГСТТАССТГССГТГТСС 22. ТГССАТГТСТТАССГТТАССТС 23. ССАТГТТТАССГТТАССТС	<i>M. tuberculosis</i> , <i>aroA</i> мРНК енолпирувилшжимат-3-фосфат синтазы	206–226 185–205 194–220 194–117

*Индекс d во всех олигонуклеотидах опущен.

Схема



значительному (до 90%) ингибированию роста бактерий при концентрациях 2.5–10 мкМ.

Для продолжения работы нами синтезированы олигонуклеотиды 24–27 (схема), которые отличаются от эффективно ингибирующих рост бактерий *M. smegmatis* олигонуклеотидов 14 и 15 наличием 3'- или 3'- и 5'-фосфатов. Для синтеза таких олигонуклеотидов был использован 5'-фосфат ОН мономер (*Cruachem*) – соединение А, а для введения 18-звенной «ножки» (CH₂CH₂O)₆ соответствующий мономер (*Clontech*) – соединение Б.

При синтезе олигонуклеотид-3'-фосфатов исходный полимер с любым нуклеозидом конденсировали с соединением А, затем с Б (если вводили линкер) или с нуклеозид-3'-амидофосфитом.

При синтезе олигонуклеотид-5'-фосфатов нельзя применять стандартную процедуру выделения полученного

олигонуклеотида с помощью ВЭЖХ в обращенно-фазовом варианте, используя гидрофобные свойства монометокситритильной группы, поэтому для повышения выхода конечного продукта мы увеличивали стандартную концентрацию А в 2 раза.

В дальнейшем мы планируем к олигонуклеотидам 24–27 ковалентно присоединить по фосфатной группе низкомолекулярные лиганды, узнаваемые бактериальными рецепторами, чтобы добиться проникновения ОТФ в бактерии без участия этамбутола.

Авторы выражают благодарность Э. Рапапорту за предоставленные данные по ингибирующей активности синтезированных олигонуклеотидов.

Часть работы по синтезу ОТФ выполнена в Вустерском центре биомедицинских исследований (США) в лаборатории П. Ч. Замечника.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (96-04-50397) и гранта G. Harold and Leila Y. Mathers Foundation.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agrawal S. // TIBTECH. 1996. 14. P. 376.
2. Sharma H.W., Narayanan R. // BioEssays. 1995. 17. P. 1055.
3. Takayama K., Kilburn J.O. // Antimicrob. Agents Chemother. 1989. 33. P. 1493.
4. Stephen A. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. // J. Mol. Biol. 1990. 215. P. 403.
5. Padmapriya A.A., Tang J., Agrawal S. // Antisense Res. Dev. 1994. 4. P. 185.
6. Zon G., Stec W.J. / Oligonucleotides and Analogs /ed. F. Eckstein. Oxford, 1991. P. 99.
7. MacKellar C., Graham D., Will D.W., Burgess S., Brown T. // Nucleic Acids Res. 1992. 20. P. 3411.
8. Cirillo J.D., Weisbrod T.R., Pascopella L., Bloom B.R., Jacobs W.R., Jr. // Mol. Microbiol. 1994. 11. P. 629.

Поступила в редакцию 16.09.97