



РАЗРАБОТКА МЕТОДА СИНТЕЗА CpG-ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

М.-А. И. Идилов

Идилов М.-А.И.

Биотехнологическая компания «MDinc», г. Москва, Россия.

E-mail: idilov@mdinc.ru

Ключевые слова:

CpG-олигонуклеотиды,
олигорибонуклеотиды,
иммунотерапия,
онкология

В этой статье описывается новый метод синтеза 2'-О-метоксиметильных мономеров, применимых для эффективного автоматизированного синтеза 2'-О-модифицированных олигорибонуклеотидов, используемых для проведения иммунотерапии онкологических заболеваний с локализацией в желудочно-кишечном тракте.

Введение

Рак является второй из основных причин смерти в мире. В 2019 году от онкологических новообразований умерли свыше 9,5 миллионов человек. Одним из самых распространённых методов лечения рака является химиотерапия – лечение заболевания путем введения в организм пациента химиотерапевтического агента, являющегося ядом или токсином, атакующего не только клетки злокачественной опухоли, но и здоровые клетки больного. Из-за отсутствия селективности, на сегодняшний день, одной из важных задач современной онкологии и фармакологии является разработка соединений, ингибирующих рост опухолей, избирательно воздействуя на раковые клетки и не оказывая негативного воздействия на организм. Несмотря на большое количество проводимых исследований, остается открытым вопрос о поиске и применении эффективных противоопухолевых препаратов, способных к селективному воздействию на рак [1, 2].

Главными мишенями действия лекарственных средств нового поколения должны являться специфические компоненты раковых клеток, необходимые для их существования и размножения. В нормальных соматических клетках существует механизм контроля пролиферации, обусловленный постепенным укорочением концевых участков хромосом, так называемых теломер, в каждом цикле клеточного деления. Раковые клетки обладают способностью обходить этот механизм и тем самым приобретать свойство имморталиности – неограниченного репликативного потенциала [3, 4].

Особой группой соединений, исследуемой в настоящее время в качестве потенциального лекарственного препарата для проведения противораковой терапии, являются короткие нуклеотидные последовательности (олигонуклеотиды), комплементарные



к матричной РНК белка, участвующего в развитии заболевания, и способные к ингибированию трансляции матричной РНК данного белка [5].

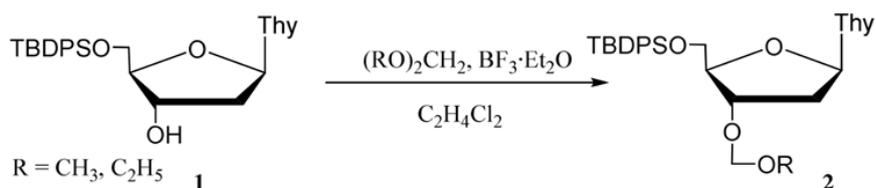
Основная часть

Синтез рибонуклеотидных мономеров

Для проведения исследования необходимо было разработать метод синтеза 2'-О-модифицированных олигорибонуклеотидов, комплементарных к иммунным контрольным точкам Т-лимфоцитов и Т-киллеров человеческого организма [6].

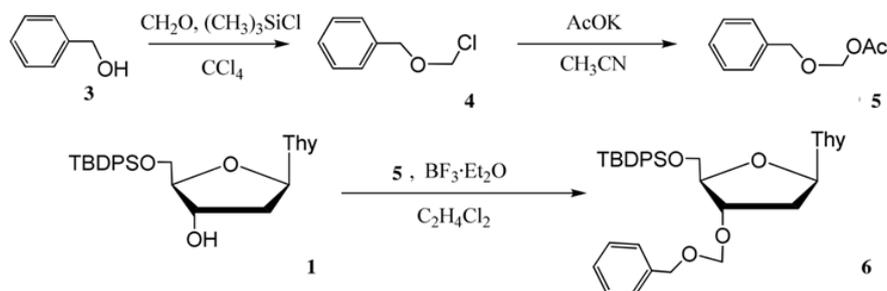
С целью подбора условий снятия 3'-гидроксильной функции, не приводящих к расщеплению и миграции межнуклеотидных связей, было синтезировано соединение (2). Для этого 5'-О-(трет-бутилдифенилсилил)тимидин в присутствии эфира трехфтористого бора обработали диметоксиметаном.

При обработке соединения (2) 1М раствором LiI в ацетонитриле в присутствии HCl 0.01М было обнаружено, что это приводит к значительному удалению 3'-О-метоксиметильной группы, на основании чего был сделан вывод, что обработка 2'-О-метоксиметильных олигорибонуклеотидов соляной кислотой не будет приводить к их деградации [7]. Схема реакции может быть представлена следующим образом:



В ходе выполнения работы, главной задачей являлось снизить стоимость синтеза, поэтому для объективности оценки выбора тимидиновой производной было принято решение помимо 5',3'-О-защищенных тимидиновых производных, содержащих метоксиметильную группу, синтезировать два соединения, содержащих в 3-положении этоксиметильную и бензилоксиметильную группу, и, сравнив время и ресурсы, затраченные на синтез, определить соединение, которое будет использовано в качестве мономера для дальнейшего синтеза.

Введение этоксиметильной группы осуществляли по аналогии с введением метоксиметильной группы по нижеприведенной схеме с использованием диэтоксиметана. Для получения соединения, содержащего бензилоксиметильную группу, синтез осуществлялся в несколько стадий:

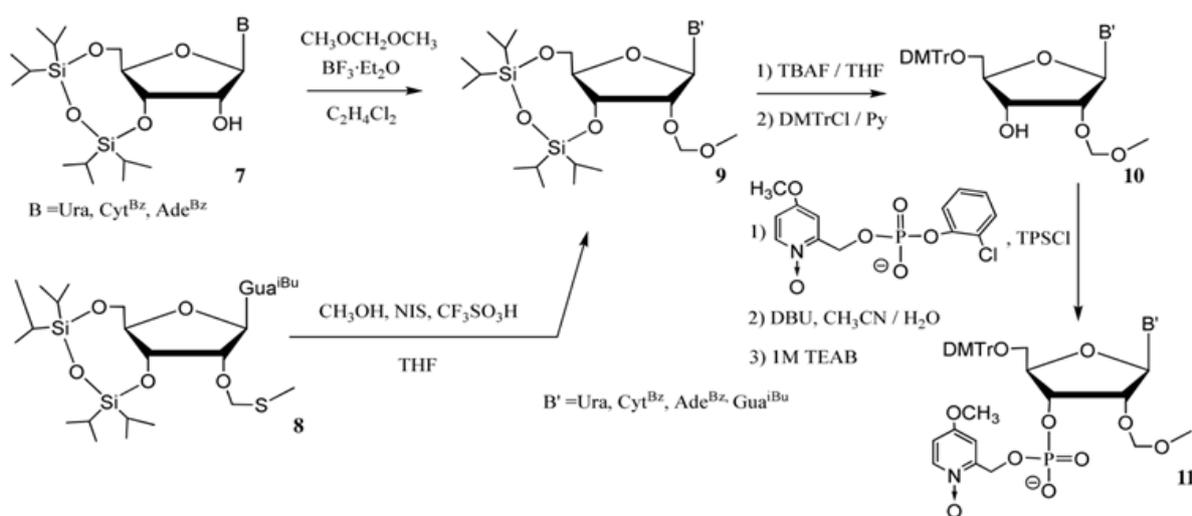




На первом этапе бензиловый спирт (3) обрабатывали на протяжении 2-х часов параформом и триметилхросиланом в треххлористом углероде, полученный α -хлорэфир (4) кипятили с ацетатом калия в ацетонитриле, в результате чего был получен ацетоксиметилбензиловый эфир (5). Далее, (1) конденсировали с (5) в присутствии эфирата трехфтористого бора, в результате чего было получено соединение (6) – 5',3'-O-защищенная тимидиновая производная, содержащая в 3'-положении бензилоксиметильную группу [8].

Бензилоксиметильная и этоксиметильная группы также удалялись обработкой LiI в присутствии 0.01M HCl. Путем проведения эксперимента было установлено, что скорость их удаления оказалась ниже, чем скорость удаления метоксиметильной группы, что связано с ее меньшими размерами и в связи с чем она была выбрана для дальнейшего синтеза.

Для выведения полностью заблокированных нуклеозидов (9), в течение 2-х часов, в присутствии эфирата трехфтористого бора в 1,2-дихлорэтане избытком диметоксиметана были обработаны производные уридина, цитидина и аденозина (7).



Для удаления TIPDS-группы и получения метоксиметильных производных мы приняли решение выделенные нуклеозиды (9) обрабатывать 1M раствором TBAF и THF в течение 1 часа. Время обработки и концентрация реагентов определялись опытным путем.

Метоксиметильные производные диметокситритилировали, и далее полученные соединения (10) обрабатывали (4-хлорфенил)-(1-оксидо-4-метокси-2-пиколил)фосфатом и 2,4,6-три-изопропилбензолсульфонил- хлоридом (TPSCl), после чего полученное соединение было обработано диазабициклоундецином (DBU) в водном ацетонитриле.

Нами было обнаружено, что производные гуанозина, в связи с деградацией связей между нуклеозидами, при обработке диметоксиметаном образовывали большое количество флуоресцирующего побочного продукта (40%), в связи с чем в данном случае синтез 2'-O-метоксиметильной-производной (9) мы осуществляли путем обработки



метилтиометильной производной (8) трифторметансульфоновой кислотой и сульфидом никеля еси тетрагидрофурана и метанола (25:1) в течение получаса.

Синтез, деблокирование и очистка 2'-О-модифицированных олигорибонуклеотидов

Синтез осуществлялся фосфотриэфирным методом на синтезаторе фирмы «Applied Biosystems» модель – 381А. В качестве смол использовались универсальные CPG-носители фирмы «GR». Для оценки эффективности наращивания цепи проводилось спектрофотометрическое измерение концентрации образующегося в ходе реакции карбокатиона при длине волны 478 и 498 нм. Цикл элонгации цепи составил 7,5 минут и представлен в таблице 1.

Таблица 1. Цикл элонгации цепи олигонуклеотида

Стадия	Реагенты	Время, мин
Детритилирование	3%-ная дихлоруксусная кислота в дихлорметане	1,0
Промывка	Ацетонитрил	1,0
Промывка	Ацетонитрил-пиридин (3:1, об/об)	0,5
Конденсация	0.05М мономерный синтон; 0.15М TPSCl в смеси ацетонитрил-пиридин (3:1, об/об)	3,0
Промывка	Ацетонитрил-пиридин (3:1, об/об)	0,5
Кэппирование	Уксусный ангидрид – 1-метилимидазол – ацетонитрил (1:1:8, об/об)	0,5
Промывка	Ацетонитрил	1,0

По завершению наращивания цепи, производилось удаление Р-защитной 1-оксидо-4-метокси-2-пиколильной группы: процесс деблокирования фосфатных остатков осуществлялся путем обработки олигонуклеотида 1М раствором LiI в ацетонитриле при комнатной температуре в течение 3 ч.

2'-О-модифицированные олигорибонуклеотиды были получены от лаборатории «Lumiprobe» на универсальном CPG-носителе и для их отщепления от носителя и деблокирование ацильных защитных групп продукт обрабатывали смесью 28%-ного раствора водного аммиака и этанола (3:1) в течение 4-х часов при температуре 60 °С.

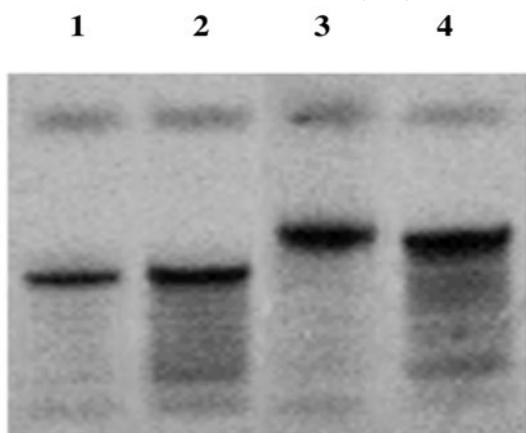


Рис. 1. Электрофореграмма олигонуклеотидов до (1,3) и после (2,4) их обработки в денатурирующем 15%-ном растворе

N-азидометилбензоильная группа с гетероциклических оснований олигорибонуклеотидов была удалена путем реакции с 30%-ной трифторуксусной кислотой, однако это привело к частичной деградации цепи, что отражено на электрофореграмме (рис. 1).

Как известно, при проведении электрофореза фрагменты ДНК мигрируют в геле под воздействием электрического поля. При этом отрицательно заряженный сахарофосфатный остов молекулы



двигается в сторону положительно заряженного анода. Длинные молекулы мигрируют в геле медленнее, в связи с чем, после разделения молекулы ДНК, при визуализации молекулы при помощи флуоресцентных красителей ксиленианола и бромфенолового голубого в УФ-лучах, менее длинные молекулы, подвергнутые деградации цепи, будут расположены выше, чем длинные, не подвергнутые данному явлению молекулы, что продемонстрировано на фотографии (рис. 1) в отраженном УФ-свете при 254 нм [9, 10].

Суммарный выход продукта и последовательности олигонуклеотидов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Последовательности и выходы синтезированных олигонуклеотидов

Последовательность	Выход на стадии конденсации, %	Итоговый выход, %
r(UUUUUUUUUUUUUUUUU)	99,2	56
r(AUGGUGACCGACGCCA)	98,5	51
r(CGCUCUCGUCGCUCUCAUGU)	97,4	47
r(AAGAAGAGCCUGGAGCCCAUCU)	98,1	50
r(AGAUGGGCUCCAGGCUCUUCUU)	97,6	48
r(GCUCUCGUCGCUCUCAUG)dTT	98,3	49
r(CAUGGAGAGCGACGAGAGC)dTT	97,7	55
r(UUUUUUUUUUUUUUUUU)	99,1	59
r(CGAUCUCAUACCUCUCAU)	98,9	57

Выводы

Описанный метод синтеза, подразумевающий использование новых фосфолирующих реагентов, содержащих О-нуклеофильную каталитическую Р-защитную группу, позволяет повысить выход продукта на 14% и сократить время синтеза в два раза.

Также синтезированные опытные образцы комплементарны к человеческой ДНК, что делает их перспективными для дальнейшего исследования в качестве лекарственного компонента иммунотерапии рака.

Литература

1. Berglof A., Turunen J.J., Gissberg O., Bestas B., Blomberg K.E., Smith C.I. Agammaglobulinemia: causative mutations and their implications for novel therapies. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2013. Vol. 9 (12). P. 1205-1221. DOI: 10.1586/1744666X.2013.850030.
2. Yue X., Q. J. He Chen. Combination strategies to overcome resistance to the BCL2 inhibitor venetoclax in hematologic malignancies. *Cancer Cell Int.* 2020. Vol. 20:524. DOI: 10.1186/s12935-020-01614-z.
3. Ben-Ali M., Kechout N., Mekki N., et al. Barbouche Genetic Approaches for Definitive Diagnosis of Agammaglobulinemia in Consanguineous Families. *J. Clin. Immunol.* 2020. Vol. 40(1). P. 96-104. DOI: 10.1007/s10875-019-00706-4. 6.
4. Nijman I.J., Montfrans van J.M., Hoogstraat M., et al. Targeted next-generation sequencing: a novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. Vol. 133(2). P. 529-534. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.08.032.
5. Kanegane H., Hoshino A., Okano T., et al. Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Allergol. Int.* 2018. Vol. 67(1). P. 43-54. DOI: 10.1016/j.alit.2017.06.003.
6. Dengjel J., Kratchmarova I., Blagoev B. Receptor tyrosine kinase signaling: a view from quantitative proteomics. *Mol. Biosyst.* 2009. Vol. 5. № 10. P. 1112-1121. DOI: <https://doi.org/10.1039/B909534A>.



7. **Mohamed A.J., Yu L., Bäckesjö C.M., Vargas L., Faryal R., Aints A., Christensson B., Berglöf A., Vihinen M., Nore B.F., Smith C.I.** Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domainю. *Immunol. Rev.* 2009. Vol. 228. №. 1. P. 114-131. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22714-6_5.
8. **Herman S.E., Gordon A.L., Hertlein E., et al.** Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood.* 2011. Vol. 117. № 23. P. 6287-6296. DOI: 10.1182/blood-2011-01-328484.
9. **Bernard S., Danglade D., Gardano L., et al.** Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma. *Int. Journal of Cancer.* 2015. Vol. 136. № 12. P. 2761-2774. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-18257-5_24.
10. **Robak T., Robak P.** BCR signaling in chronic lymphocytic leukemia and related inhibitors currently in clinical studies. *Int. Rev. Immunol.* 2013. Vol. 32(4). P. 358-376. DOI: 10.3109/08830185.2013.786711.

Поступила в редакцию 16.09.2020

Принята к опубликованию 20.10.2020