

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАН БЕЛАРУСИ»

УДК 535.371 + 577.112.4 + 577.113.4 + 577.113.6

МАРТЫНЕНКО-МАКАЕВ
ЮРИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**СИНТЕЗ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЛИНКЕРОВ С
РАЗВЕТВЛЕННОЙ СТРУКТУРОЙ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ И
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 02.00.10 — Биоорганическая химия

Минск, 2020

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель: **Шманай Вадим Владимирович**, кандидат химических наук, заведующий лабораторией химии биоконъюгатов Института физико-органической химии НАН Беларуси

Официальные оппоненты: **Королёва Елена Вадимовна**, доктор химических наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории органических композиционных материалов Института химии новых материалов НАН Беларуси

Щербин Дмитрий Григорьевич, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией нанобиотехнологий Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

Оппонирующая организация: Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»

Защита состоится «21» мая 2020 г. в 10.00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 5/2 в зале заседаний Ученого Совета, e-mail: litvin@iboch.by, тел. +375173698615.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан « 17 » апреля 2020 г.

Ученый секретарь

Совета по защите диссертаций Д 01.21.01

доктор химических наук

 Р.П. Литвиновская

ВВЕДЕНИЕ

Современная биотехнология позволяет получать биополимеры заданной структуры в количествах, достаточных для их прикладного применения в клинической диагностике и терапии. Постсинтетическая ковалентная модификация биомолекул существенно улучшает их свойства или позволяет получать материалы гибридной структуры с принципиально новыми свойствами.

Развитие современных методов клинической диагностики с применением синтетических олигонуклеотидов (полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени, ПЦР-РВ) требует постоянного улучшения характеристик ДНК-зондов (олигонуклеотидов, модифицированных флуоресцентными красителями и тушителями флуоресценции). Чувствительность ПЦР-РВ можно повысить увеличением интенсивности флуоресценции и снижением фоновой флуоресценции ДНК-зондов.

Другое современное и очень важное применение синтетических олигонуклеотидов – генная терапия. Реализация доставки интерферирующих и антисмысловых РНК в клетку является сложной задачей, которую можно решить с помощью специальных лигандов (так называемая адресная доставка). Недавно открытый механизм доставки генетического материала в клетки печени основан на использовании специальных модификаций, содержащих три остатка N-ацетилгалактозамина (GalNAc), обеспечивающих связывание терапевтических олигонуклеотидов с асиалогликопротеиновым рецептором (ASGPR) на поверхности гепатоцитов.

Последние несколько десятилетий интенсивно разрабатываются новые терапевтические средства на основе рекомбинантных белков и пептидов. Для повышения их эффективности (в частности, улучшения фармакокинетики) требуется ковалентное присоединение биосовместимых полимерных материалов, увеличивающих размер молекул и снижающих иммуногенность.

Множественное введение модификаций является важным средством улучшения качества биоконъюгатов, а введение модификаций по одному сайту связывания позволяет снизить нежелательную потерю биологической активности белков и олигонуклеотидов. Расширение использования биотехнологических материалов в диагностике и медицине привело к интенсивному развитию химии биоконъюгатов. Важнейшими ее достижениями являются биоортогональные реакции и клик-химия, в частности, азид-алкиновое циклоприсоединение.

Реагенты-разветвители, являющиеся объектом исследования настоящей диссертационной работы, представляют собой гетерофункциональные соединения, содержащие несколько одинаковых модификаций, которые необходимо ввести в биомолекулу (флуоресцентные, аффинные метки, полиэтиленгликоли, функциональные группы и т.п.), а также активную группу для взаимодействия с биомолекулой. Применение новых методов биоконъюгации, в том числе на основе

биоортогональных реакций, и реагентов-разветвителей открывает широкие возможности для улучшения свойств белковых и олигонуклеотидных биоконъюгатов, которые исследуются в настоящей работе.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами. Диссертационная работа выполнена в Лаборатории химии биоконъюгатов Отдела органической химии Государственного научного учреждения «Институт физико-органической химии НАН Беларуси» в рамках задания 4.05 «Разработка реагентов и методов синтеза флуоресцентно модифицированных биомолекул и ДНК-зондов» ГПНИ «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал», подпрограмма 4 «Химфармсинтез» (2011-2015 гг., № г.р. 20140841), задания 2.05 «Разработка методов синтеза реагентов для сайт-специфической модификации белков, липидов и нуклеиновых кислот» ГПНИ «Химические технологии и материалы», подпрограмма «Биологически активные вещества» (2016-2020 гг., № г.р. 20160516), гранта БРФФИ № М15ИНД-010 «Сайт-специфическая модификация биологически активных белков неиммуногенными полимерами с использованием новых подходов биоортогональной химии» (2015-2016, № г.р. 20150684), молодежного гранта БРФФИ-РФФИ № М17РМ-047 «Усиление флуоресценции ДНК-зондов для молекулярной диагностики» (2017-2019 гг., № г.р. №20171525 от 15.08.2017 г.).

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы: 2. Химический синтез и продукты (утверждены постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 № 190), а также приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь: 4. Медицина, фармация, медицинская техника (фармацевтические технологии, медицинские биотехнологии, лекарственные средства, диагностические препараты и тест-системы); 5. Химические технологии, нефтехимия: производство новых химических продуктов (утверждены Указом Президента Республики Беларусь от 22 апреля 2015 г. № 166).

Цель и задачи исследования. Цель работы – синтез реагентов-разветвителей и их применение для точечного введения множественных модификаций в нуклеиновые кислоты и белки для улучшения их фотофизических, биохимических и фармакологических свойств в биоаналитических и медицинских приложениях с сохранением биологической активности биополимеров.

В соответствии с поставленной целью, выполнение работы сводилось к решению следующих задач:

1. Исходя из пентаэритрита, синтезировать реагенты-разветвители для точечного введения в молекулы белков и олигонуклеотидов двух или трех терминальных алкиновых групп.

2. Исходя из 3,5-диаминобензойной кислоты, синтезировать реагенты для точечного введения в биомолекулы двух флуорофоров, зафиксированных в пространственной конформации, сохраняющей флуоресцентные характеристики красителей.
3. Разработать метод контролируемой биоортогональной двухстадийной модификации белков. Синтезировать азидное производное разветвленного полиэтиленгликоля и применить его для двухстадийного пегилирования белка.
4. На основе трис(гидроксиметил)аминометана синтезировать реагенты-разветвители и модифицированные твердофазные носители для множественного введения N-ацетилгалактозамина в синтетические олигонуклеотиды.
5. С помощью гибкоцепных реагентов-разветвителей получить ДНК-зонды для полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) со сниженной фоновой флуоресценцией.
6. С помощью реагентов-удвоителей с пространственно-фиксированными флуорофорами получить меченые олигонуклеотиды с повышенной интенсивностью флуоресценции при сохранении степени модификации биомолекул.
7. Разработать универсальный метод введения трех модификаций в нуклеиновые кислоты по реакции циклоприсоединения азидов к алкинам и применить его для получения дендритоподобных олигонуклеотидных конъюгатов.

Объект исследования – функциональные производные O,O',O'',O'''-тетракис(гидроксипропил)пентаэритрита, трис(гидроксиметил)аминометана и 3,5-диаминобензойной кислоты в качестве синтетической основы реагентов-разветвителей для получения множественно модифицированных биомолекул.

Предмет исследования – методы синтеза симметричных и несимметричных реагентов-разветвителей и их применение для введения большего числа модификаций в биомолекулы при сохранении количества сайтов модификации для максимального сохранения биологической активности.

Научная новизна:

1. Синтезирован ряд новых функциональных реагентов-разветвителей на основе пентаэритритового каркаса – фосфорамидитов, активированных эфиров, модифицирующих твердофазных носителей по оптимизированной методике, и продемонстрировано их эффективное применение для точечного введения двух или трех терминальных алкиновых групп в различные положения синтетических олигонуклеотидов. Впервые показано, что тушители флуоресценции, введенные с помощью таких реагентов в ДНК-зонды для ПЦР-РВ, позволяют повысить чувствительность анализа за счет существенного снижения фоновой флуоресценции.

2. Разработан способ синтеза реагентов-раздвоителей оригинальной структуры, в которых, посредством жесткого каркаса на основе 3,5-диаминобензойной кислоты, два флуорофора зафиксированы в конформации, сохраняющей

флуоресцентные характеристики красителей. Впервые показано, что олигонуклеотиды, меченные такими реагентами, обладают более высокой интенсивностью флуоресценции при сохранении числа сайтов модификации.

3. Разработан метод двухстадийного биоортогонального модифицирования белков, основанный на контролируемом введении терминальной алкиновой функции с помощью низкомолекулярных реагентов с последующей реакцией азид-алкинового присоединения с разветвленными полиэтиленгликолями на основе трис(гидроксиметил)аминометана.

4. Разработан универсальный метод множественного введения модификаций в нуклеиновые кислоты реакцией циклоприсоединения азидов к алкинам с помощью симметричных гомополифункциональных реагентов-разветвителей.

5. Трис(гидроксиметил)аминометановый каркас применен для синтеза новых реагентов для введения в терапевтические олигонуклеотиды тройной модификации N-ацетилгалактозамина (GalNAc), обеспечивающей их адресную доставку в гепатоциты. Впервые показана возможность получения олигонуклеотидов с модификациями дендритоподобной структуры по реакции циклоприсоединения азидов к алкинам с помощью триалкинового фосфорамидита на основе пентаэритрита и три-GalNAc-азиды на основе трис(гидроксиметил)аминометана.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эффективный метод синтеза новых фосфорамидитных реагентов и модифицирующих твердофазных носителей с двумя и тремя терминальными алкиновыми группами, N-оксисукцинимидного эфира с тремя алкиновыми группами алкилированием пропаргилбромидом O,O',O'',O'''-тетракис(гидроксипропил)пентаэритрита. Двухстадийное множественное введение модификаций в биомолекулы по реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения азидов к алкинам.

2. Эффективный метод синтеза новых фосфорамидитного и азидного реагентов-раздвоителей ацилированием пентафторфениловым эфиром пивалоилзащипленного 5-карбокCIFлуоресцеина производных 3,5-диаминобензойной кислоты, жесткая структура которой обеспечивает сохранение флуоресцентных свойств метки и, как следствие, аддитивное увеличение интенсивности флуоресценции меченных ими олигонуклеотидов.

3. Двухстадийное биоортогональное пегилирование белков азидным производным полиэтиленгликоля разветвленной структуры по реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения азидов к алкинам.

4. Эффективный метод синтеза новых азидных, алкиновых реагентов и модифицирующих твердофазных носителей на основе трис(гидроксиметил)аминометана для биоортогонального введения в синтетические ДНК- и РНК-олигонуклеотиды модификаций разветвленной структуры с тремя остатками N-ацетилгалактозамина для рецептор-опосредованной доставки терапевтических нуклеиновых кислот в гепатоциты.

5. Универсальный метод множественного введения модификаций в нуклеиновые кислоты реакцией [3+2]-диполярного циклоприсоединения азидов к алкинам с помощью симметричных гомополифункциональных реагентов-разветвителей.

Личный вклад соискателя. Разработка методик и химический синтез описанных соединений выполнены автором самостоятельно. Анализ литературных данных, постановка задач, дизайн структур, планирование работы, установление и доказательство структуры синтезированных соединений, обсуждение и оформление результатов для опубликования статей проводилось совместно с научным руководителем к.х.н. В.В. Шманаем. Регистрация и анализ масс-спектров осуществлялись совместно с к.х.н. Т.С. Зацепиным (МГУ и «Сколтех», Москва), д.х.н. В.А. Коршуном (ИБХ РАН, Москва) и д-ром Кристофером Вайзе (Свободный университет, Берлин, ФРГ). Биологические испытания выполнены: ПЦР-РВ – к.х.н. Д.А. Рязанцевым (ИБХ РАН, Москва), *in vitro* и *in vivo* испытания миРНК, модифицированных кластерами GalNAc – профессором Анастасией Хворовой (Институт РНК лекарств, Вустер, Массачусетс, США).

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертационной работы были представлены на XXVI международной научно-технической конференции «Реактив-2012» (Минск, 2012), международной междисциплинарной научной конференции «Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Новый Свет, Украина, 2013), 3-й международной конференции по органической химии «Organic Synthesis – driving force of life development» (Тбилиси, Грузия, 2014), XII Немецком пептидном симпозиуме (Дармштадт, Германия, 2015), Международной конференции «XXII International roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids», (Париж, Франция, 2016), XIII Международной научной конференции молодых ученых «Молодежь в науке - 2016» (Минск, 2016), IV Международной научной конференции молодых ученых «Biotechnology: Science and Practice» (Ереван, Армения, 2017).

Опубликованность результатов диссертации. Основные результаты диссертации опубликованы в 18 научных работах, в том числе 8 статьях в рецензируемых научных журналах и тезисах 10 докладов конференций. Общее число опубликованных страниц – 76 (7,1 авторских листов, из них 6,6 авторских листов – статьи в рецензируемых журналах).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, трех глав, заключения, библиографического списка. Полный текст диссертации составляет 167 стр., в том числе 40 рисунков на 23 стр., 64 схемы на 48 стр., 6 таблиц на 6 стр.; библиографический список состоит из списка источников, который включает 289 наименований на 19 стр. и списка публикаций соискателя (18 наименований на 3 стр.); 7 приложений на 11 стр.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Подходы к синтезу реагентов-разветвителей для биоконъюгации (обзор литературы).

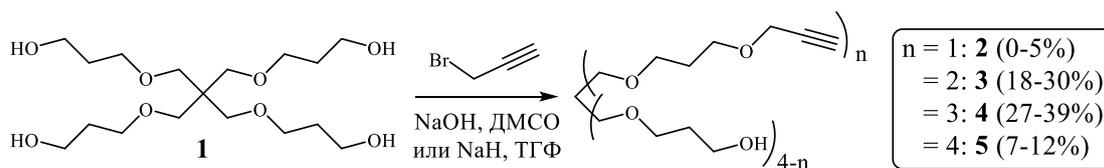
Обобщены литературные данные по синтезу реагентов-разветвителей, в том числе содержащих биоортогональные функциональные группы, методам получения конъюгатов различных модификаторов с белками и нуклеиновыми кислотами, а также методам получения и способам применения множественно меченных белков и нуклеиновых кислот с использованием реагентов-разветвителей, минимизирующих потерю биологической активности биомолекул.

Глава 2. Синтез реагентов-разветвителей для множественного введения модификаций в белки и нуклеиновые кислоты (обсуждение результатов).

Реагент-разветвитель, пригодный для химической модификации биомолекул, должен содержать одну реакционноспособную группу, обеспечивающую первоначальное ковалентное связывание, а также несколько функциональных групп с «ортогональной» реакционной способностью для последующего введения требуемых модификаций (флуоресцентных или аффинных меток, синтетических или природных полимеров и т.д.). Используемые в процессе модификации химические реакции не должны приводить к существенной потере биологической активности субстрата, что обычно подразумевает их проведение в условиях, близких к физиологическим. Среди множества известных, для модификации биомолекул наиболее подходящими реакциями являются взаимодействие активированных (оксисукцинимидных) эфиров с аминогруппами белков, а также различные варианты азид-алкинового циклоприсоединения (клик-химия, CuAAC).

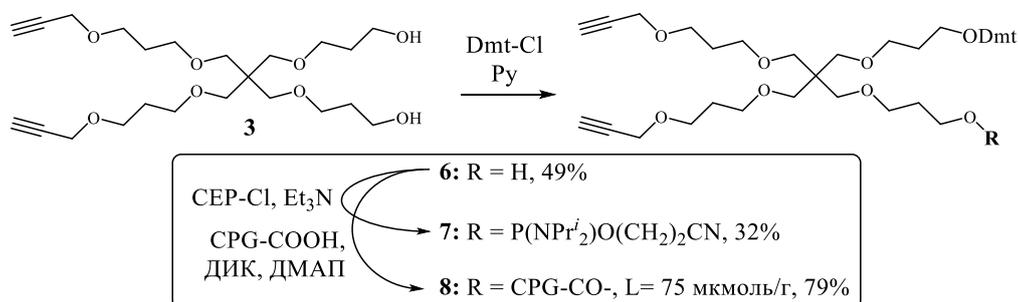
В качестве основы разветвителей в данном исследовании мы использовали доступный симметричный тетраол пентаэритрит, несимметричную 3,5-диаминобензойную кислоту, а также несимметричный трис(гидроксиметил)аминометан, широко применяемый в качестве биосовместимого компонента буферных систем.

2.1. Синтез диацетиленовых и триацетиленовых реагентов-разветвителей на основе пентаэритрита. Усиленное тушение фоновой флуоресценции в ДНК-зондах. В качестве исходного соединения для создания реагентов-разветвителей использовали пентаэритрит, удлинённый пропиленгликолем **1**, который алкилировали пропаргилбромидом. В зависимости от условий проведения реакции получали преимущественно продукт ди- (NaH, ТГФ) или тризамещения (NaOH, ДМСО).

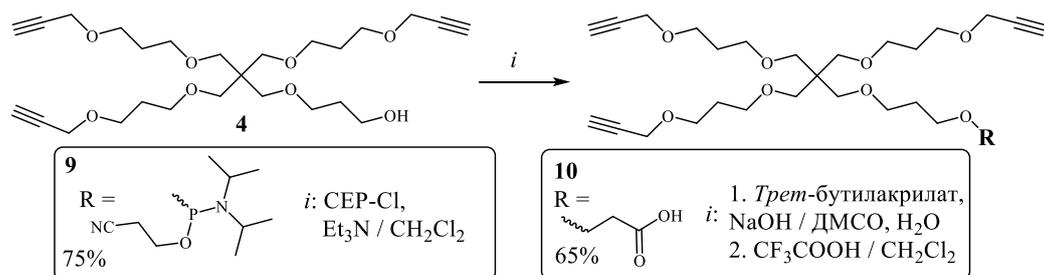


Одну гидроксильную группу соединения **3** защитили диметокситритильной (Dmt) группой. Полученный спирт **6** фосфитилировали 2-цианоэтоксиди-N,N'

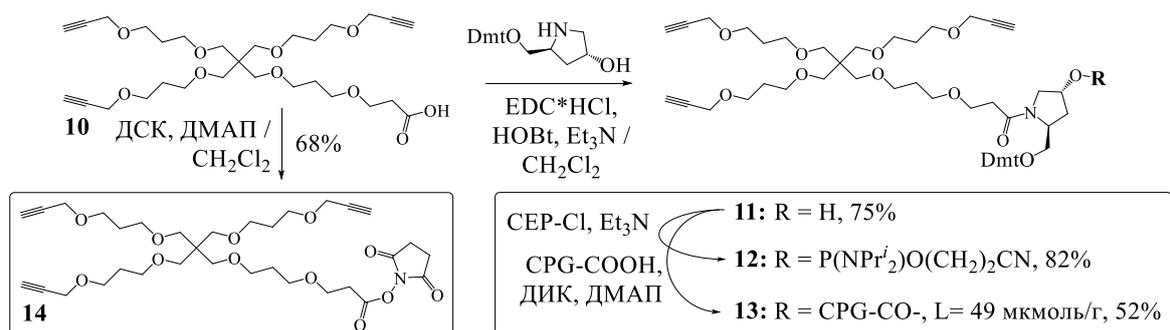
диизопропилхлорофосфоримидом (СЕР-Cl) или конденсировали с карбоксильными группами, находящимися на поверхности стекла с контролируемым размером пор (СРG-СООН) в присутствии N,N'-диизопропилкарбодимида (ДИК) и N,N-диметиламинопиридина (ДМАП). Удельное содержание функциональных групп в материале **8** составило 75 мкмоль на 1 г твердофазного носителя (выход 79%).



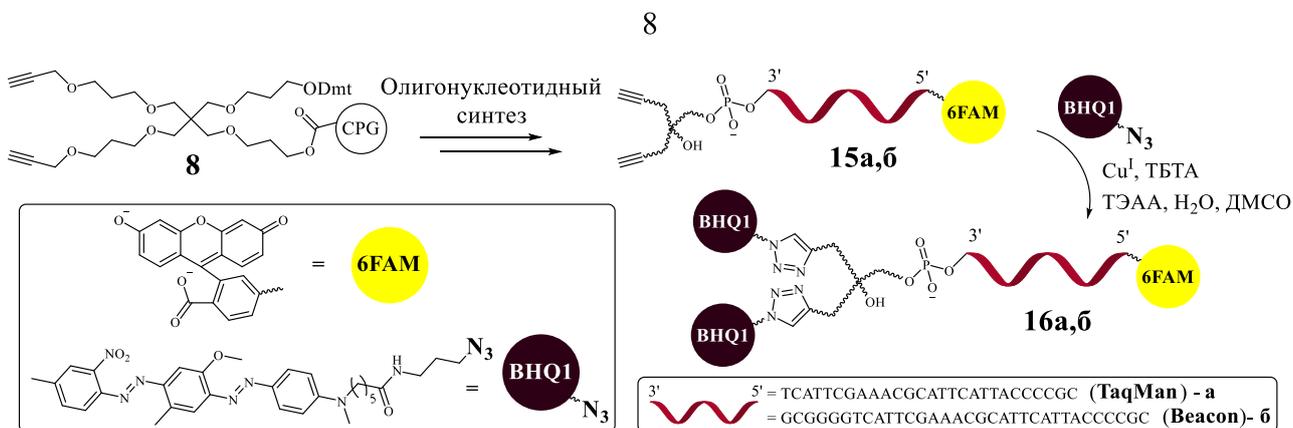
Из соединения **4**, содержащего три алкиновые группы, фосфитилированием с СЕР-Cl получили реагент **9** для введения модификаций в олигонуклеотиды по 5'-положению. При помощи *трет*-бутилакрилата была получена кислота **10**, из которой, путем встраивания линкера на основе (2*S*,4*R*)-4-гидроксипролинола, были получены фосфорамидит **12** и модифицирующий твердофазный носитель **13**.



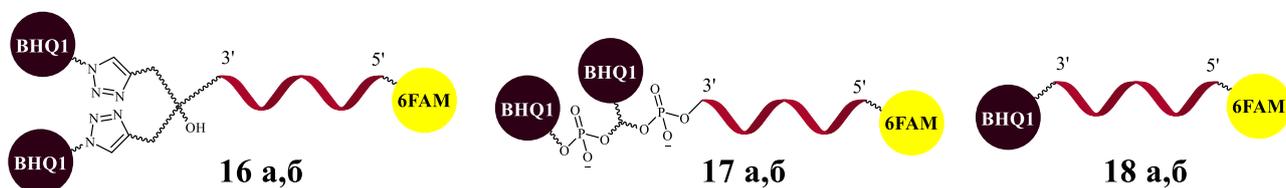
Синтезирован N-оксисукцинимидный эфир триалкинового производного **14**, позволяющий вводить три терминальные алкиновые группы в биомолекулы ацилированием аминогрупп для последующей их модификации клик-реакцией.



Из модифицирующего твердофазного носителя **8** в условиях автоматического олигонуклеотидного синтеза получили ДНК-зонды **15a,б** с двумя терминальными алкиновыми группами по 3'-положению и с 6-карбоксифлуоресцеином в качестве флуорофора по 5'-положению. После выделения и очистки при помощи ВЭЖХ полученные зонды модифицировали азидным производным азокрасителя, играющего роль тушителя флуоресценции (коммерческое название ВHQ1), по реакции медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения.



В условиях ПЦР-РВ полученные конъюгаты **16а,б** сравнили с двумя зондами: стандартного дизайна **18а,б** (одна молекула тушителя флуоресценции и одна молекула флуорофора) и с зондом с одной молекулой флуорофора и двумя молекулами тушителя флуоресценции **17а,б**, введенными последовательно фосфорамидитным методом.



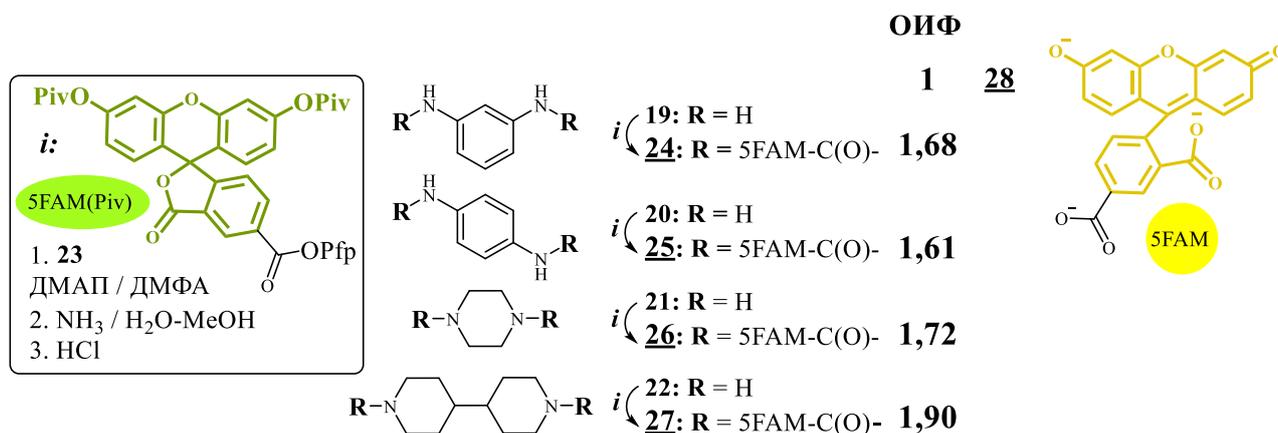
Установлено, что в условиях ПЦР-РВ с расщеплением зонда (TaqMan) компактная пара тушителей в **17а** обладает лучшим соотношением сигнал/шум по сравнению со стандартным зондом **18а**, и имеет явное преимущество перед зондом **16а** с двумя молекулами BHQ1: фоновая флуоресценция для **17а** уменьшается вдвое, а увеличение флуоресценции утраивается по сравнению с **16а**.

Конъюгаты **166-186**, испытанные в другом варианте ПЦР – молекулярный маяк (Beacon), обладали лучшим соотношением сигнал/шум по сравнению с зондом стандартного дизайна **186**; причем зонд **166**, содержащий две молекулы тушителя флуоресценции, соединенных параллельно, показал более чем 5-кратное увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с зондом стандартного дизайна **186**, а при последовательном соединении тушителей (**176**) относительное увеличение интенсивности было почти 10-кратным.

Полученные результаты демонстрируют чрезвычайную важность линкера для достижения максимально высокой эффективности тушения флуоресценции в зонде и могут быть использованы для многократного повышения чувствительности анализа методом ПЦР-РВ.

2.2. Синтез реагентов-разветвителей для множественного введения флуорофора в биомолекулы. Возможность пространственного сближения флуорофоров при их множественном введении в биомолекулы обычно приводит к явлению взаимного тушения флуоресценции и не позволяет добиться желаемого усиления сигнала. Решением этой проблемы может быть использование реагентов, содержащих несколько фрагментов флуорофора, соединенных жесткокаркасным линкером, ограничивающим конформационную подвижность молекулы. С целью

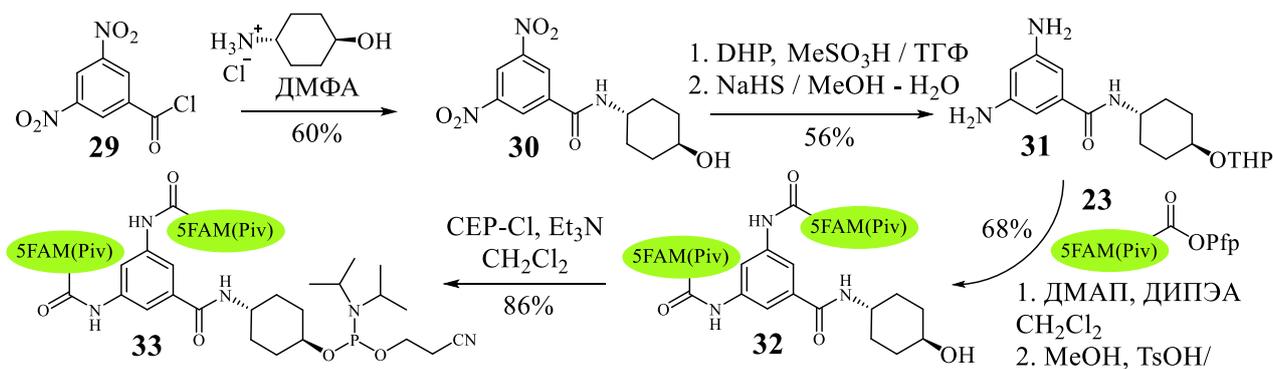
проверки данного предположения нами был синтезирован ряд модельных соединений путем ацилирования диаминов **19-22** пентафторфениловым эфиром пивалоилзащищенного 5-карбоксивлуоресцеина **23** в присутствии ДМАП в N,N-диметилформамиде (ДМФА), с последующим аммонолизом сложноэфирных защитных групп. Относительные интенсивности флуоресценции (ОИФ) полученных продуктов **24-27** определяли по величине относительного квантового выхода флуоресценции в сравнении с 5-карбоксивлуоресцеином **28**.



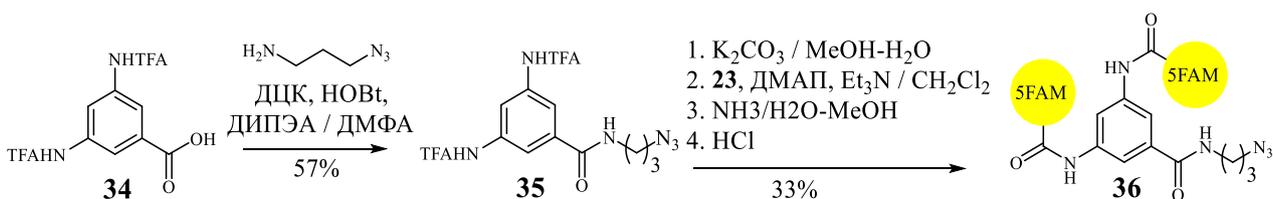
Практически аддитивное увеличение (1,61-1,90) относительной интенсивности флуоресценции модельных соединений подтвердило предположение о возможности предотвращения взаимного тушения флуоресценции флуорофоров, находящихся на расстоянии существенно меньшем ферстеровского радиуса, благодаря жесткому линкеру, ограничивающему конформационную подвижность молекулы.

В отличие от модельных соединений **24-27**, реагент для введения модификаций в биомолекулы должен содержать дополнительную функциональную группу, обеспечивающую возможность ковалентного связывания с субстратом. Возможность реализации данной методологии была продемонстрирована нами путем использования в качестве исходного соединения коммерчески доступной 3,5-динитробензойной кислоты, строение которой предполагает легкое формирование фрагмента *мета*-фенилендиамина, присутствующего в модельном веществе **24**, за счет восстановления нитрогрупп.

С этой целью ацилировали *транс*-4-аминоциклогексанол при помощи хлорангидрида 3,5-динитробензойной кислоты (**29**). Защита спиртовой функции в полученном продукте **30** и последующее восстановление нитрогрупп проводили стандартным образом, что привело к производному 3,5-диаминобензойной кислоты **31**. Введение двух остатков флуорофора осуществляли путем ацилирования аминогрупп соединения **31** активированным эфиром **23**. После высвобождения и фосфитилирования гидроксильной группы получен фосфорамидит **33**.

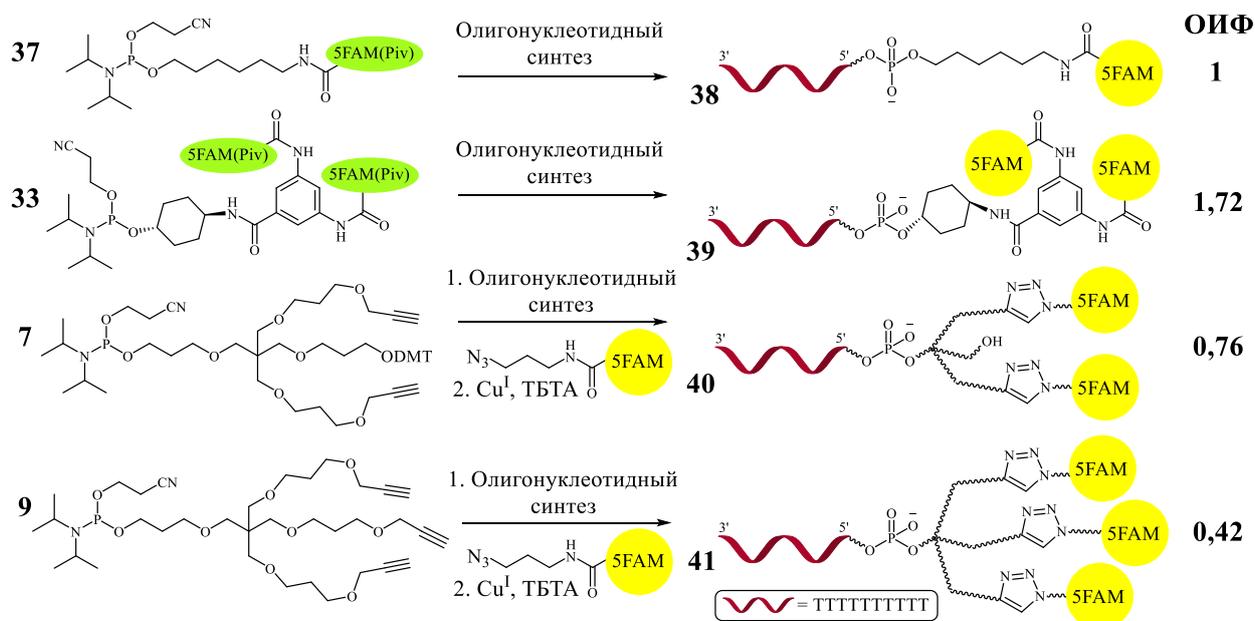


Синтезировано также азидное производное **36**, позволяющее с помощью клик-химии в мягких физиологических условиях проводить модификацию биомолекул, в которые предварительно была введена алкиновая функция. 3,5-бис-Трифторацетамидобензойную кислоту **34** конденсировали с 3-азидпропан-1-амином в присутствии дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) и 1-гидроксibenзотриазола (НОВt). После снятия трифторацетамидной защиты полученный диамин ацилировали аналогично получению амида **32** из амина **31**, с последующим аммонолизом сложноэфирных защитных групп.

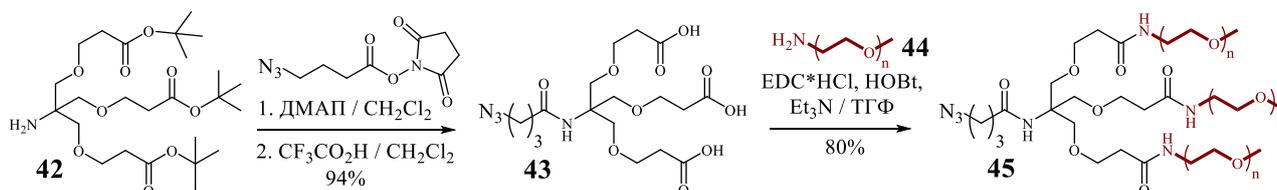


Для получения фотофизических характеристик флуорофора в составе био-конъюгатов синтезирована серия олигонуклеотидов, модифицированных 5-карбоксифлуоресцеином (5FAM) по 5'-положению цепи. Метки вводили при помощи коммерчески доступного фосфорамидита 5-карбоксифлуоресцеина **37** (образец сравнения **38**), а также впервые полученных нами фосфорамидита дублера 5-карбоксифлуоресцеина **33** (олигонуклеотид **39**) и фосфорамидитов гибкоцепного разветвителя с двумя и тремя терминальными алкиновыми группами (**7** и **9**, соответственно), с постсинтетическим азид-алкиновым циклоприсоединением азидного производного 5-карбоксифлуоресцеина (**40**, **41**).

Сравнением величин относительного квантового выхода флуоресценции **40** и **41** относительно **38**, содержащего один фрагмент 5-карбоксифлуоресцеина, нами установлен эффект самотушения при использовании линкеров гибкой структуры. Относительный квантовый выход флуоресценции **39** в сравнении с **38** демонстрирует лишь незначительное присутствие эффекта самотушения, что позволяет повысить интенсивность флуоресценции в случае использования жесткокаркасного линкера.

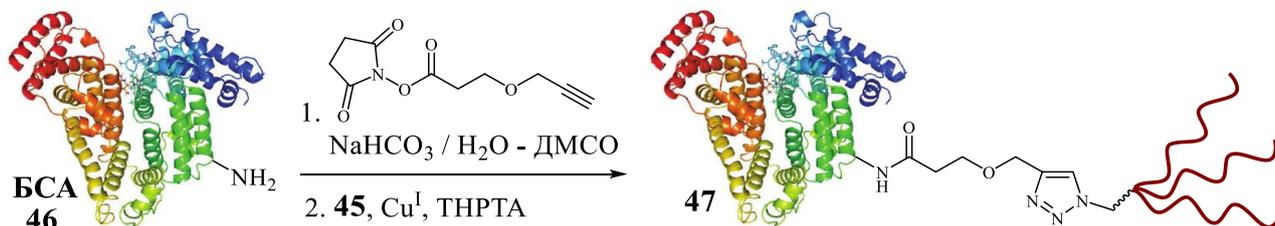


2.3. Двухстадийное пегилирование белков азидным производным разветвленного полиэтиленгликоля (ПЭГ). Модификация белков разветвленными ПЭГ обладает рядом преимуществ (лучшее сохранение биологической активности, сниженная иммуногенность, доступность монометоксиполиэтиленгликоля мПЭГ) по сравнению с линейными ПЭГ той же молекулярной массы. Нами разработан метод синтеза разветвленных ПЭГ с заданной молекулярной массой из более доступных линейных мПЭГ на основе **42**, полученного реакцией трис(гидроксиметил)аминометана с *tert*-бутилакрилатом, ацилированным по аминогруппе N-оксисукцинимидным эфиром γ -азидомасляной кислоты в присутствии ДМАП. Карбоксильные группы деблокировали трифторуксусной кислотой и полученную трикарбоновую кислоту **43** без дополнительной очистки конденсировали с аминопроизводным мПЭГ **44** со средней молекулярной массой 340 Да в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорида (EDC·HCl) и 1-гидоксибензотриазола (HOBT).



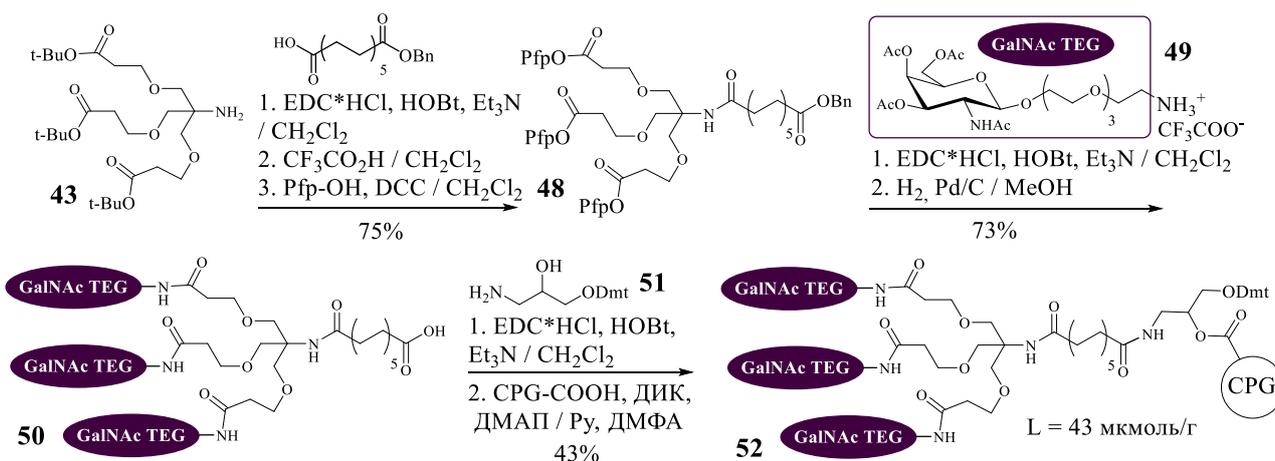
В описанных в литературе методах пегилирования белков применяются 10-20-кратные избытки реагентов, что усложняет выделение и очистку целевых конъюгатов и существенно увеличивает их стоимость. Нами разработан метод двухстадийной модификации, позволяющий существенно оптимизировать получение пегилированных белков, что было подтверждено на примере бычьего сывороточного альбумина (БСА) **46**. На первой стадии введено 37 алкиновых групп на молекулу белка ацилированием ϵ -аминогрупп лизина 50-кратным избытком NHS-эфира пропилоксипропионовой кислоты. Конъюгат был легко очищен от низкомолекулярных реагентов гель-проникающей хроматографией и введен в

реакцию циклоприсоединения с азидным производным трис-мПЭГа **45**. Синтезированный конъюгат **47** выделяли гель-фильтрацией. Определенное масс-спектрометрически (МАЛДИ) отношение числа введенных модификаций к избытку реагента, составило: 1,3/1,5; 4,6/5,0; 8,1/10,0; 8,1/20,0, что подтверждает высокую эффективность метода.



2.4. Синтез реагентов для множественного введения аффинного лиганда N-ацетилгалактозамина (GalNAc) в терапевтические олигонуклеотиды. Разработан метод синтеза ранее не описанного твердофазного носителя для модификации олигонуклеотидов тремя остатками GalNAc по 3'-положению для рецепторопосредованного эндоцитоза в гепатоциты, которые имеют на поверхности специфически реагирующие асиалогликопротеиновые рецепторы.

Амин **43** конденсировали с бензиловым эфиром додекандиовой кислоты. Селективно высвобожденные из *tert*-бутиловых эфиров три карбоксильные группы этерифицировали пентафторфенолом. Трис-пентафторфениловый эфир **48** конденсировали с тетраэтиленгликолевым аминопроизводным **49** (GalNAc TEG). Полученную после гидрогенолиза кислоту **50** конденсировали с моно(диметокси)третиллированным производным 3-аминопропандиола-1,2 **51** в присутствии EDC·HCl и HOBT. Полученный спирт конденсировали с CPG-COOH в присутствии ДИК и ДМАП. Удельное содержание модификатора на поверхности твердофазного носителя **52** составило 43 мкмоль/г.

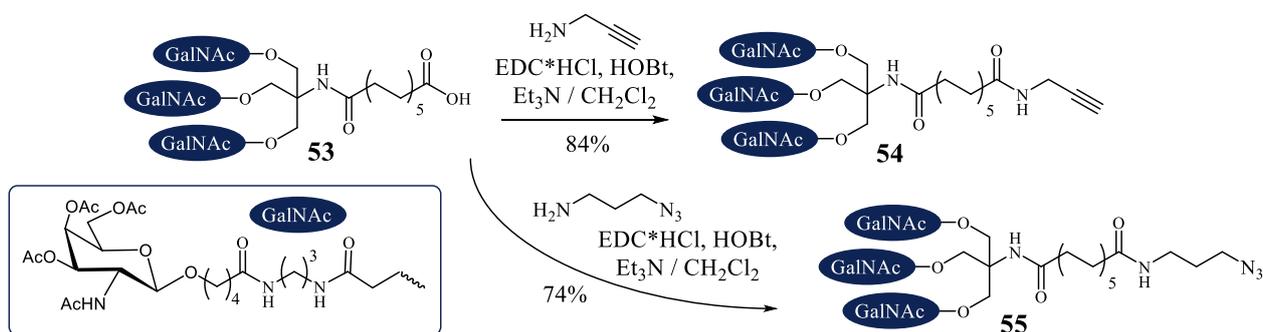


Разработанный реагент **52** позволил получить синтетические РНК-олигонуклеотиды, модифицированные трехвалентными кластерами GalNAc. Установлено, что конъюгат, полученный из ранее не описанного оригинального реагента **52**, как и конъюгат структуры, запатентованной компанией Alnylam,

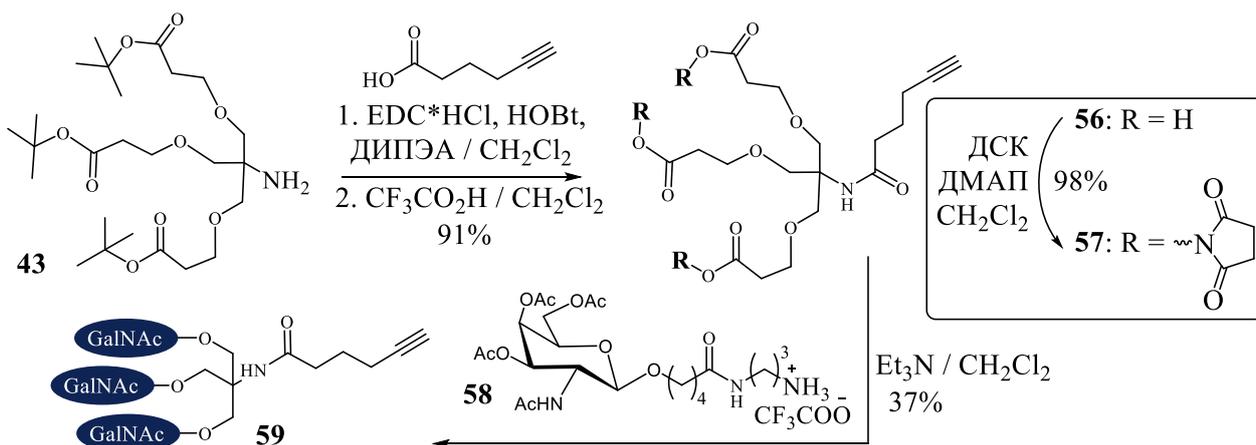
находящийся на стадии клинических испытаний, показывают одинаковую скорость интернализации в первичных гепатоцитах.

Для решения задачи по введению кластеров N-ацетилгалактозамина в миРНК по другим положениям олигонуклеотидной цепи получены универсальные функциональные производные трис-GalNAc: азидные и алкиновые, которые затем могут быть присоединены к, соответственно, алкиновым или азидным группам, заранее введенным в олигонуклеотиды.

Алкиновые и азидные производные **54** и **55**, содержащие три остатка GalNAc, получены ацилированием 3-азидопропан-1-амина и пропаргиламина кислотой **53**, которая является основой модификатора РНК, запатентованного компанией Alnylam.



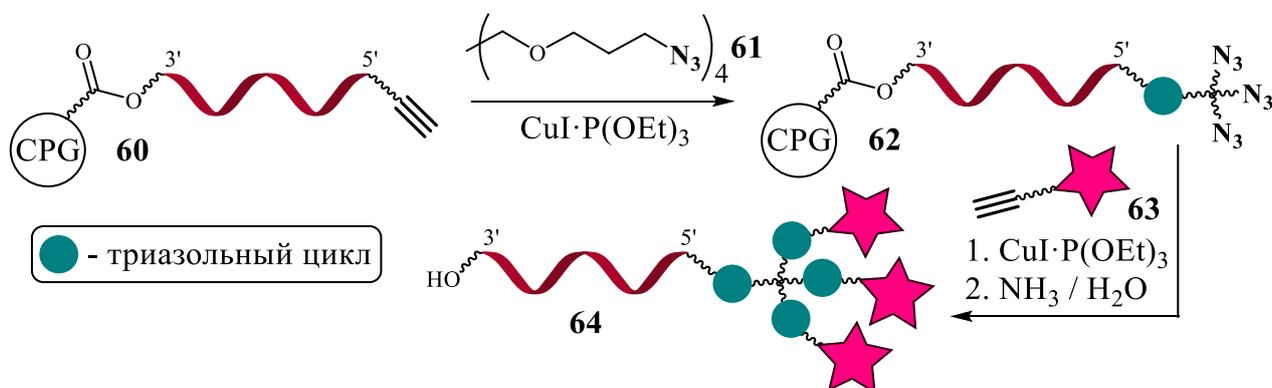
Кроме того, получено алкиновое производное с другой длиной алкинового линкера. Аминогруппу соединения **43** ацилировали 5-гексиновой кислотой в присутствии EDC·HCl и HOBT, карбоксильные группы полученного продукта **56** превращали в N-оксисукцинимидные эфиры действием дисукцинимидилкарбоната. Конденсацией полученного соединения **57** с аминопроизводным N-ацетилгалактозамина **58** получали целевое соединение **59**.



2.5. Разработка универсального метода множественного введения модификаций в синтетические олигонуклеотиды. Получение дендритоподобных олигонуклеотидных конъюгатов. Разработан новый метод множественного введения модификаций в олигонуклеотиды реакцией азид-алкинового циклоприсоединения с помощью симметричных гомополифункциональных

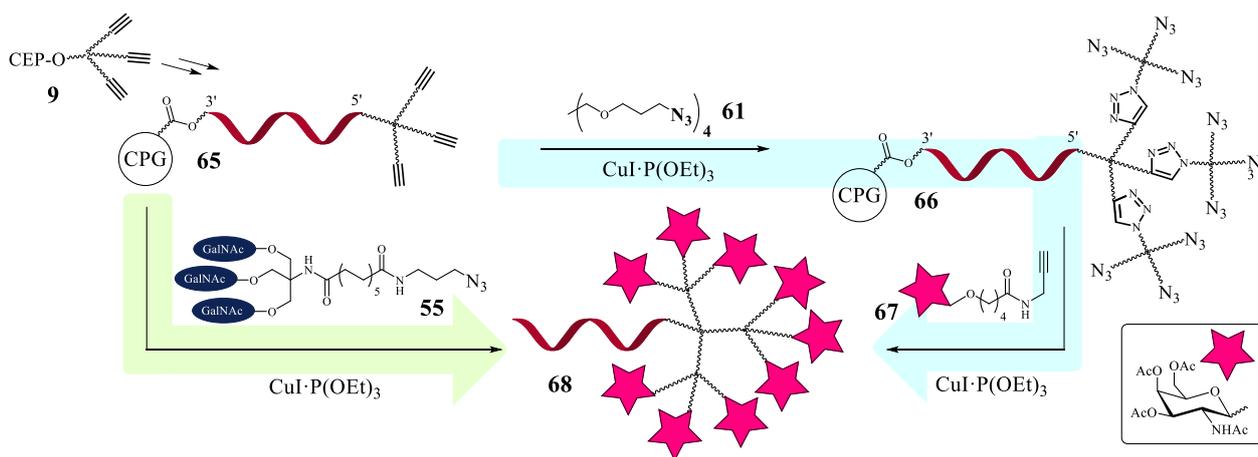
реагентов-разветвителей, более доступных в сравнении с описанными выше гетерофункциональными линкерами.

В основе предлагаемого подхода – меньшая подвижность олигонуклеотидных цепей, связанных с твердофазным носителем, а также легкость отмывки избытка реагентов, что позволяет избежать поперечных сшивок симметричными разветвителями.



На первом этапе олигонуклеотид с терминальной ацетиленовой модификацией по 5'-положению, введенной соответствующим фосфорамидитным реагентом, ковалентно связанный с твердофазным носителем, вступал в реакцию циклоприсоединения с избытком реагента-разветвителя **61**, содержащего четыре азидные группы, одна из которых реагировала с алкиновым фрагментом на олигонуклеотиде **60**. Избыток реагента отмывали и проводили реакцию с алкиновым производным модификатора **63**. Затем модифицированный олигонуклеотид **64** снимали с носителя и выделяли в очищенном виде по стандартной методике.

Этим методом получен ряд поливалентных конъюгатов N-ацетилгалактозамина с олигонуклеотидами.



Олигонуклеотид **65**, в который предварительно были введены три алкиновые группы при помощи несимметричного фосфорамидита **9**, вводили в реакцию циклоприсоединения с азидным производным N-ацетилгалактозамина **55** и тетраазидом **61**. Последующее циклоприсоединение **66** с алкиновыми производными N-ацетилгалактозамина **67** позволило получить конъюгаты дендритоподобной структуры с 9 (**68**) и 18 остатками GalNAc.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработаны эффективные методы синтеза фосфорамидитных реагентов и модифицирующих твердофазных носителей на основе пентаэритрита. Получены синтетические олигонуклеотиды с двумя и тремя терминальными алкиновыми группами по 3'- и 5'- положениям. Синтезирован активированный эфир на основе пентаэритрита для введения трех терминальных алкиновых модификаций в молекулы белка [1, 2, 6, 9, 10, 12, 14, 18].

2. Разработаны эффективные методы синтеза азидного и фосфорамидитного реагентов оригинальной структуры на основе 3,5-диаминобензойной кислоты для точечного введения в биомолекулы двух флуорофоров, зафиксированных в пространственной конформации, сохраняющей флуоресцентные характеристики красителей (дублер-красители) [4, 10, 11, 16].

3. В условиях ПЦР-РВ показано, что ДНК-зонды, содержащие удвоенный фрагмент тушителя флуоресценции, обладают сниженной в 2-6 раз фоновой флуоресценцией [1 – 3, 10, 12].

4. Установлено увеличение интенсивности флуоресценции конъюгата олигонуклеотида с дублер-красителем в 1,7 раза по сравнению с олигонуклеотидом, модифицированным одной молекулой карбоксифлуоресцеина [4, 10, 11, 16].

5. Разработан эффективный метод синтеза азидного реагента с тремя остатками мПЭГ (трис-мПЭГ) на основе трис(гидроксиметил)аминометана. Установлено, что разработанный двухстадийный метод биоортогональной модификации позволяет ввести до 8 молекул трис-мПЭГ в одну молекулу БСА [8, 13, 17].

6. Разработаны эффективные методы синтеза азидного и двух алкиновых реагентов на основе трис(гидроксиметил)аминометана с тремя фрагментами N-ацетилгалактозамина (треблер-GalNAc) в синтетические ДНК- и РНК-олигонуклеотиды. Разработан эффективный метод получения модифицирующего твердофазного носителя треблер-GalNAc оригинальной структуры с удлиненными линкерами. Получены терапевтические нуклеиновые кислоты, модифицированные треблер-GalNAc для рецептор-опосредованной доставки в гепатоциты [5, 7, 15].

7. Впервые получены олигонуклеотиды с модификациями дендритоподобной структуры, содержащие 9 и 18 фрагментов GalNAc на основе разработанных триацетиленовых и тетраазидных производных пентаэритрита и треблер-GalNAc азида [5, 15].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Синтезированные ди-, триалкиновые амидофосфитные, триалкиновый N-оксисукцинимидный, тетраазидный и тетраалкиновый реагенты могут использоваться как универсальные разветвляющие линкеры для создания самоорганизующихся наноструктур и для множественного введения различных меток в биомолекулы высокоэффективным биоортогональным методом клик-химии.
2. Разработанный универсальный метод введения трех модификаций в нуклеиновые кислоты с использованием тетрагомофункциональных производных в условиях циклоприсоединения азидов к алкинам может значительно удешевить процесс получения тривалентных конъюгатов синтетических ДНК и РНК с различными метками.
3. Полученные данные о влиянии структуры линкера на фотофизические свойства флуорофоров и синтезированные реагенты могут использоваться при синтезе флуоресцентных зондов для повышения чувствительности различных молекулярно-биологических и медицинских аналитических методов.
4. Методология двухстадийной модификации белков может стать эффективным методом получения конъюгатов с минимальным количеством сайтов связывания и с минимальным расходом реагентов. Использование реагентов-разветвителей позволяет получать ПЭГ-модификаторы требуемой молекулярной массы из коммерчески доступных монометоксиполиэтиленгликолей, что значительно снизит стоимость производства пегилированных белков.
5. Разработанные реагенты с тремя остатками N-ацетилгалактозамина прошли опытно-промышленное испытание в условиях автоматического твердофазного синтеза олигонуклеотидов для создания новых средств генной терапии.

Список публикаций соискателя ученой степени

Статьи в журналах:

1. Two-dye and one- or two-quencher DNA probes for real-time PCR assay: synthesis and comparison with a TaqMan™ probe / D.Y. Ryazantsev, D.A. Tsybulsky, I.A. Prokhorenko, M.V. Kvach, Y.V. Martynenko*, P.M. Philipchenko, V.V. Shmanai, V.A. Korshun, S.K. Zavriev // Analytical and bioanalytical chemistry. – **2012**. – V. 404, №. 1. – P. 59-68.
2. Design of molecular beacons: 3' couple quenchers improve fluorogenic properties of a probe in real-time PCR assay / D.Y. Ryazantsev, M.V. Kvach, D.A. Tsybulsky, I.A. Prokhorenko, I.A. Stepanova, Y.V. Martynenko*, S.V. Gontarev, V.V. Shmanai, S.K. Zavriev, V.A. Korshun // Analyst. – **2014**. – V. – 139. – P. 2867-2872.
3. Molecular beacons with JOE dye: Influence of linker and 3' couple quencher / D.A. Tsybulsky, M.V. Kvach, D.Y. Ryazantsev, I.O. Aparin, A.A. Stakheev, I.A. Prokhorenko, Y.V. Martynenko*, S.V. Gontarev, A.A. Formanovsky, T.S. Zatsepin,

- V.V. Shmanai, V.A. Korshun, S.K. Zavriev // *Molecular and Cellular Probes*. – **2016**. – V.30. – P. 285-290.
4. Дублер красители для усиления флуоресценции ДНК-зондов в молекулярной диагностике / Ю.В. Мартыненко-Макаев, В.А. Брылев, В.В. Удодова // *Весті НАН Беларусі. Сер. хім.* – **2017**. – №3. – С.72-78.
 5. Automated Solid-Phase Click Synthesis of Oligonucleotide Conjugates: From Small Molecules to Diverse N-Acetylgalactosamine Clusters / V.M. Farzan, E.A. Ulashchik, Y.V. Martynenko-Makaev, M.V. Kvach, I.O. Aparin, V.A. Brylev, T.A. Prikazchikova, S.Y. Maklakova, A.G. Majouga, A.V. Ustinov, G.A. Shipulin, V.V. Shmanai, V.A. Korshun, T.S. Zatsepin // *Bioconjugate Chemistry*. – **2017**. – V.28. – P. 2599-2607.
 6. Синтез реагентов-разветвителей на основе пентаэритрита для модификации белков и нуклеиновых кислот по реакции [3+2] диполярного циклоприсоединения / Ю.В. Мартыненко-Макаев, В.В. Удодова, О.Л. Шарко, В.В. Шманай // *Журнал Общей Химии* – **2018**. – Т. 3. – С.425-434.
 7. Novel Cluster and Monomer-Based GalNAc Structures Induce Effective Uptake of siRNAs in Vitro and in Vivo / V.K. Sharma, M.F. Osborn, M.R. Hassler, D. Echeverria, S. Ly, E.A. Ulashchik, Y.V. Martynenko-Makaev, V.V. Shmanai, T.S. Zatsepin, A. Khvorova, J.K. Watts // *Bioconjugate Chemistry*. – **2018**. – V.29 (7). – P.2478–2488.
 8. Контролируемое пегилирование белков азидными реагентами-разветвителями с помощью клик-химии / Ю.В. Мартыненко-Макаев, А.С. Круглик, О.Л. Шарко, В.В. Шманай // *Весті НАН Беларусі. Сер. хім.* – **2018**. – №2. – С.197-203.

Тезисы докладов:

9. Реагенты-разветвители для модификации олигонуклеотидов / Ю.В. Мартыненко*, М.В. Квач, В.В. Шманай // XXVI международная научно-техническая конференция Реактив-**2012**: материалы международной научно-технической конференции. Минск, 2012 г. – С. 74.
10. Получение модифицированных красителей и тушителей флуоресценции на основе разветвленных линкеров для днк-зондов / Ю.В. Мартыненко*, И.Л. Лысенко, Д.А. Цыбульский, М.В. Квач, В.В. Шманай // Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения: материалы международной междисциплинарной научной конференции. Новый Свет, Украина, 27.05-1.06 **2013** г. – С.401.
11. Реагенты-разветвители для модификации олигонуклеотидов / Ю.В. Мартыненко*, В.В. Шманай // V международная конференция «Химия, структура и функция биомолекул»: материалы международной научно-практической конференции. Минск, **2014** г. – С. 120.

12. Double quenched molecular beacons in real-time PCR assay / Y.V. Martynenko*, D.A. Tsybulsky, M.V. Kvach, V.V. Shmanai // 3-rd International Conference of Organic Chemistry (ICOC-2014) «Organic Synthesis – driving force of life development»: abstract book notebook. Tbilisi, Georgia, 25.09-28.09 **2014** – P. 187-188.
13. Branching Reagents for Smart PEGylation of Proteins / Y. Martynenko*, O. Sharko, O. Avrutina, V. Shmanai // XII German Peptide Symposium: abstract book notebook. Darmstadt, Germany, 18.03-21.03 **2015**. – P. 42.
14. Branching reagents for multiple alkyne incorporation / Y.V. Martynenko*, A.P. Kadutskii, V.V. Udodava, V.V. Shmanai // Dombay organic conference cluster DOCC-2016: abstract book notebook. Russia, Dombay, 29.05-04.06 **2016**. – P. 186.
15. Synthesis of oligonucleotide conjugates by solid phase CuAAC: application to GalNAc dendrimers and dye labelling / E. Ulaschik, V. Farzan, Y. Martynenko*, I. Aparin, V. Brylev, A. Ustinov, G. Shipulin, A. Majouga, V. Kotelianski, V. Shmanai, V. Korshun, T. Zatsepin. // XXII International roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids: abstract book notebook. France, Paris, 18.07-22.07 **2016**. – P. 340-341.
16. Дублер красители для усиления флуоресценции днк-зондов для молекулярной диагностики / Ю.В. Мартыненко*, В.А. Брылев, В.В. Удодова // XIII Международная научная конференция молодых ученых «Молодежь в науке – 2016»: материалы международной научной конференции. Минск, 22.11-25.11 **2016**. – С. 357.
17. Site-directed N-terminus two-step PEGylation of proteins / Y. Martynenko-Makaev, M. Rebkavets, E. Ulashchik, A. Kruhlik, V. Shmanai // IV International scientific conference of young researchers «Biotechnology: Science and Practice»: abstract book notebook. Armenia, Yerevan, 28.09-30.09 **2017**. – P. 111.
18. Novel molecular toolbox for DNA modification / M.Y. Tatulchenkov, V.V. Normantovich, A.N. Fedorkevich, Y.V. Martynenko-Makaev, O.L. Sharko, N.V. Pilchenko, V.V. Smamai // 19th Tetrahedron Symposium: abstract book. Riva del Garda, Italy, 26.06-29.06 **2018**. – P. 2.02.

*Ю.В. Мартыненко в 2017 году сменил фамилию на Мартыненко-Макаев

РЕЗЮМЕ

Мартыненко-Макаев

Юрий Владимирович

Синтез полифункциональных линкеров с разветвленной структурой для модифицирования белков и нуклеиновых кислот

Ключевые слова: реагенты-разветвители, «клик»-реакция, флуоресценция, ПЦР-РВ, пегилирование, адресная доставка миРНК, дендримеры.

Цель работы: синтез реагентов-разветвителей и их применение для точечного введения множественных модификаций в нуклеиновые кислоты и белки для улучшения их фотофизических, биохимических и фармакологических свойств в биоаналитических и медицинских приложениях с сохранением биологической активности биополимеров.

Объекты исследования: функциональные производные тетраакис(гидроксипропил)пентаэритрита, трис(гидроксиметил)аминометана и 3,5-диаминобензойной кислоты.

Предмет исследования: синтез реагентов-разветвителей, модификация белков и нуклеиновых кислот.

Методы исследования: современные методы препаративного органического синтеза, флуориметрия, ЯМР-, электронная спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрия.

Полученные результаты и их новизна: разработаны методы синтеза реагентов-разветвителей (азидов, алкинов, фосфорамидитов, активированных эфиров, модифицирующих твердофазных носителей), содержащих две или три алкиновые группы, две молекулы флуоресцеина, три остатка метоксиполиэтиленгликоля, три остатка N-ацетилгалактозамина.

Показана возможность повышения чувствительности флуоресцентных молекулярно-биологических исследований путем усиления интенсивности флуоресценции или снижения фоновой флуоресценции. Разработан метод введения модификаций в белки с помощью двухстадийного биоортогонального подхода. Показана возможность получения олигонуклеотидов с модификациями дендритоподобной структуры для множественного введения N-ацетилгалактозамина (GalNAc), обеспечивающего их адресную доставку в гепатоциты.

Область применения: органическая и биоорганическая химия, биоконъюгация белков и нуклеиновых кислот, молекулярная биология, медицина.

SUMMARY

Martynenko-Makaev

Yury Vladimirovich

Synthesis of branched polyfunctional linkers for protein and nucleic acid modification

Keywords: branching reagents, CuAAC, fluorescence, PCR-RT, pegylation, siRNA site-direct delivery, dendrimers.

Objective of research: synthesis of branching reagents and its application for multiple site-directed modification of nucleic acids and proteins to enhance photophysical, biochemical and pharmacological properties for bioanalytical and medical applications without affecting biological activity of biomolecules.

Object of research: derivatives of pentaerythritol, tris(hydroxymethyl)aminomethane and 3,5-diaminobenzoic acid.

Subject of research: synthesis of branching reagents, bioconjugation with proteins and nucleic acids

Research methods: modern techniques of preparative organic synthesis, fluorometry, NMR-, electronic spectroscopy, high-resolution mass-spectrometry, HPLC, LCMS.

Obtained results and their novelty: Methods of synthesis of branching-reagents (azides, alkynes, phosphoramidites, activated esters, CPG derivatives) with two or three alkyne groups, two fluorescein molecules, three mPEG moieties, three N-acetylgalactosamine have been developed. It was found that enhancement of sensibility for molecular-biological methods can be reached by increasing the intensity of fluorescence or decreasing background fluorescence. A method of two-step CuAAC protein modification has been developed. It was shown that the multiple provision of N-acetylgalactosamine allows forming dendritic structures that can be used for receptor-mediated endocytosis.

Fields of application: organic and bioorganic chemistry, protein and nucleic acid bioconjugation, molecular biology, medicine.

РЭЗЮМЭ

Мартыненка-Макаеў

Юрый Уладзіміравіч

Сінтэз поліфункцыянальных линкераў з разгалінаванай структурай для мадыфікавання бялкоў і нуклеінавых кіслот

Ключавыя словы: рэагенты-разгалінавальнікі, «клік»-рэакцыя, флуарэсцэнцыя, ПЛР-РЧ, пегіліраванне, адрасная дастаўка міРНК, дендрымеры.

Мэта працы: сінтэз рэагентаў-разгалінавальнікаў і іх прымяненне для кропкавага ўвядзення множных мадыфікацый у нуклеінавыя кіслоты і бялкі для паляпшэння іх фотафізічных, біяхімічных і фармакалагічных уласцівасцяў у біяаналітычных і медыцынскіх прыкладаннях з захаваннем біялагічнай актыўнасці біяпалімераў.

Аб'екты даследавання: функцыянальныя вытворныя тетракіс(гідроксипрапіл)пентаэрытрыта, трыс(гідроксиэтыл)амінаметана і 3,5-дыамінабензойнай кіслаты.

Прадмет даследавання: сінтэз рэагентаў-разгалінавальнікаў, мадыфікацыя бялкоў і нуклеінавых кіслот.

Метады даследавання: сучасныя метады препаратывага арганічнага сінтэзу, ЯМР-, электронная спектраскапія, мас-спектраметрыя высокага распазнавання, ВЭВХ, храмата-мас-спектраметрыя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: распрацаваны метады сінтэзу рэагентаў-разгалінавальнікаў (азідаў, алкінаў, фасфарамідытаў, актываваных эфіраў, мадыфікуючых цвёрдафазных матэрыялаў), якія змяшчаюць дзве або тры алкінавыя групы, дзве малекулы флуарэсцына, тры астатку метокси поліэтиленгліколя, тры астатку N-ацэтылгалактозаміна.

Паказана магчымасць павышэння адчувальнасці флуарэсцэнтных малекулярна-біялагічных даследаванняў шляхам узмацнення інтэнсіўнасці флуарэсцэнцыі або зніжэння фонавай флуарэсцэнцыі. Распрацаваны метады ўвядзення мадыфікацый у бялкі з дапамогай двухстадыйнага біяартаганальнага падыходу. Паказана магчымасць атрымання олигануклеятыдаў з мадыфікацыямі дендрытападобнай структуры для множнага ўвядзення N-ацэтылгалактозаміна (GalNAc), які забяспечвае іх адрасную дастаўку ў гепатацыты.

Вобласць ужывання: арганічная і біяарганічная хімія, біяканьюгацыя бялкоў і нуклеінавых кіслот, малекулярная біялогія, медыцына.



Подписано в печать 14.04.2020. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная. Печать цифровая.
Гарнитура Times New Roman. Усл. печ. л. 1,43. Уч. -изд. л. 1,37. Тираж 60 экз. Заказ 28.

Отпечатано с оригинал-макета заказчика в типографии ООО «Рекленд».
220036, Республика Беларусь, г. Минск, пер. Домашевский, 9, комната 100.
Тел. +375 (29) 6716617.