

ЛУКЪЯНОВА ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

**Получение модифицированных олигонуклеотидов для
молекулярной диагностики наследственных и инфекционных
заболеваний**

02.00.10. – Биоорганическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва 2008

Работа выполнена в ООО НПФ «Литех» и Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: кандидат химических наук, доцент
Позмогова Галина Евгеньевна

Официальные оппоненты: доктор химических наук
Ходонов Андрей Александрович

кандидат химических наук
Каюшин Алексей Львович

Ведущая организация: Институт вирусологии
им. Д.И. Ивановского РАМН

Защита состоится « 23 » июня 2008 г. в 15 ч. на заседании диссертационного совета Д 212. 120. 01 при Московской государственной академии тонкой химической технологии им М.В. Ломоносова по адресу:
119571, г. Москва, пр. Вернадского, д. 86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МИТХТ им. М.В. Ломоносова. С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.mitht.ru

Автореферат разослан « » мая 2008 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета

кандидат химических наук
старший научный сотрудник

А.И. Лютик

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ¹

Актуальность проблемы:

Трудно представить современную молекулярную биологию, генетику, генетическую инженерию и медицинскую диагностику без использования синтетических олигодезоксирибонуклеотидов. Их применение в этих отраслях знания стало необходимым и даже рутинным приемом. Особую роль в развитии диагностических и генотерапевтических подходов имеют фрагменты ДНК, несущие межнуклеотидные модификации и олигонуклеотиды, снабженные концевыми флуоресцентными метками.

Совершенствование методов биоорганического синтеза олигонуклеотидов позволяет получать для решения конкретных задач олигонуклеотиды с соответствующими разнообразными модификациями. Так, например, реализовать терапевтический потенциал фрагментов ДНК для медицинских и фармацевтических целей удастся только благодаря использованию устойчивых к биодegradации аналогов олигонуклеотидов: Р-алкилфосфонатных (*Diesbach 2003, Richardson 2002*), тиофосфорильных (*Heggstad 2004, Han 2000*), тиоамидофосфитных (*Herbert, 2005*), пептидно-нуклеиновых кислот (*Nielsen 1991*) и др. Среди них наиболее изученными и часто используемыми являются тиофосфорильные олигонуклеотиды. Показано, что по гибридизационным свойствам такие аналоги близки природным фосфодиэфирам. Однако, в тоже время они достаточно стабильны в биологических жидкостях, мембранотропны и, вследствие этого, эффективны как антисмысловые олигонуклеотиды. Также применение тиофосфорильных олигонуклеотидов дает ряд преимуществ в генодиагностике и методе быстрой амплификации плазмидной ДНК (*Dean 2008, Di Giusto 2003*). С другой стороны, тиофосфорильные олигонуклеотиды и их метаболиты обладают высокой системной токсичностью. В связи с этим ведется поиск лишь частично модифицированных эффективных и менее токсичных последовательностей. Тиофосфорильная модификация сахара-фосфатного остова может приводить к функционально значимым изменениям третичной структуры олигомеров. Особенно важно изучение влияния тиофосфорильных замен на конформацию олигонуклеотидов-аптамеров (*Бессчетнова 2006*), биологическая активность которых непосредственно обусловлена их пространственной организацией (*King 2002*). Проведение таких скрининговых и структурно-функциональных исследований требует широкого набора частично модифицированных олигонуклеотидов.

¹ В руководстве работой и подготовке ее к защите принимал участие зав. кафедрой Биотехнологии МИТХТ им М.В. Ломоносова академик РАН, д.х.н., проф. Швец В.И.

Наиболее экономичным в настоящее время является автоматический параллельный синтез олигонуклеотидов на многоканальных синтезаторах, но для получения локально тиофосфорилированных олигонуклеотидов методы не созданы. В этой связи особенно актуальны как разработка стратегии и способов синтеза таких производных, так и оптимизация достоверных способов подтверждения их состава.

Интенсивное развитие методов автоматического секвенирования ДНК, ПЦР-генодиагностики в режиме реального времени (Real-Time PCR), в особенности, создание комплексных диагностических наборов, позволяющих одновременно анализировать содержание в пробе нескольких ДНК-мишеней (*Probert 2004, Ram 2005*), а также технологии микрочипов требует постоянного поиска новых флуорохромов, позволяющих расширить используемую область спектра. На сегодняшний день существуют несколько классов флуоресцентных красителей, активно применяющихся в биологии и медицине. Требования, предъявляемые к этим красителям, довольно жесткие, они должны обладать:

- спектральными свойствами в нужном диапазоне (определяются свойствами источников света регистрирующих приборов);
- химической стабильностью при твердофазном автоматическом синтезе олигонуклеотидов (например, в автоматическом ДНК-синтезаторе);
- биохимической инертностью (отсутствием неспецифических взаимодействий в ходе биохимических и молекулярно-биологических процессов).

Одними из наиболее используемых (в технологиях анализа ДНК) являются цианиновые красители. Они имеют высокий квантовый выход флуоресценции (от 0,02 до 0,5) и высокие коэффициенты поглощения, что позволяет измерять флуоресценцию при низких концентрациях метки в системе.

Оптимальными среди красителей этого класса для маркирования биополимеров являются индодикарбоцианиновые производные благодаря спектральным характеристикам в ближнем ИК-диапазоне, т.к. биоматериал (ДНК) обладает незначительной собственной флуоресценцией в диапазоне между 700-1200 нм. Спектральные свойства цианиновых красителей напрямую зависят от наличия и природы заместителей в полиметиновой цепи и гетероциклических остатках. Применение новых красителей позволит расширить возможности диагностических и аналитических методов.

Цель работы:

Цель данной работы состояла

- в разработке стратегии и способов синтеза олигонуклеотидов, несущих тиофосфорильные модификации заданной локализации;

- в оптимизации достоверных способов подтверждения состава тиофосфорильных олигонуклеотидов, в частности методами MALDI-TOF масс-спектрометрии;
- в получении новых индодикарбоцианиновых красителей со смещенными максимумами поглощения и флуоресценции и их конъюгатов с аминокислотными олигонуклеотидами.

Научная новизна и практическая ценность работы:

В результате проведенной работы были впервые разработаны приемы параллельного автоматического синтеза олигонуклеотидов, несущих различные локальные тиофосфорильные межнуклеотидные связи, с использованием сборки в «ждущем режиме» и с созданием специальных программных блоков. Подобраны условия лазерной десорбционно-ионизационной масс-спектрометрии с участием матрицы (MALDI TOF), позволившие повысить чувствительность метода (1-10 фмоль олигонуклеотида в пробе) и получать достоверные спектры тиофосфорильных аналогов олигонуклеотидов, что создает возможность надежно доказывать наличие заданного числа тиофосфорильных связей в составе синтетических последовательностей. Эффективность найденных методов продемонстрирована на примере параллельного синтеза ряда тиоаналогов известных биологически значимых олигонуклеотидов.

Также было получено 5 новых аналогов коммерческого индодикарбоцианинового красителя Cy5, имеющих различные спектральные характеристики и гидрофильные свойства. Предложенные модификации состояли во введении алкильных заместителей в бензольное кольцо и в полиметиновую цепь, а также во введении заместителя, содержащего сульфо-группу в положение при атоме азота. Перспективным оказался найденный прием использования в качестве заместителя в гетероциклической системе сульфо-группы, поскольку он позволяет не только повысить гидрофильность, но и увеличить квантовый выход флуоресценции.

Получены активированные (N-гидроксисукцинимидные) производные красителей и их конъюгаты с аминокислотными производными олигонуклеотидов. Маркированные олигонуклеотиды были испытаны в гибридизационном анализе на биологических чипах. Показано, что чувствительность анализа при использовании производных синтезированного в работе красителя (25) была в 1,4 раза выше в сравнении с производными его коммерческого аналога Cy5 (Amersham, США). Испытания показали пригодность полученных красителей для технологии биологических микрочипов. В настоящее время они используются в «Центре биологических чипов» ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН в качестве рабочего инструмента.

Другая перспективная область применения полученных конъюгатов – ПЦР ДНК-диагностика наследственных и инфекционных заболеваний. Важно отметить, что использование для проведения стандартных ПЦР-анализов олигонуклеотидных праймеров, несущих новые флуоресцентные заместители, не оказывало ингибирующего действия на процесс амплификации ДНК и не приводило к снижению чувствительности анализа.

Разработанные с участием автора методы и технологические приемы получения синтетических олигодезоксирибонуклеотидных зондов и праймеров, в том числе модифицированных (тиофосфорильных, флуоресцентномеченных, содержащих гасители флуоресценции и другие заместители), а также способы контроля их качества используются при создании новых ДНК-диагностикомов наследственных и инфекционных заболеваний человека в фирме ООО "Биотехлит" и внедрены в производство в НПФ "Литех" коммерческих диагностических наборов для определения следующих патогенов: *Bacteroides spp.*, *Chlamydia trachomatis*, *CMV*, *Epstein-Barr virus*, *Gardnerella vaginalis*, *HSV 1*, *HSV 2*, *Lactobacillus spp.*, *Mobiluncus curtissi*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*.

Публикации и апробации работы

По материалам диссертационной работы опубликовано 3 статьи в реферированных журналах и 6 тезисов на всероссийских и международных конференциях.

Объём и структура диссертации.

Диссертация изложена на _120_ страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы, включающего _93_ источника отечественной и зарубежной литературы и приложения, содержащего два акта о внедрении результатов работы в производство.

Содержание работы.

Литературный обзор.

В литературном обзоре рассмотрены флуоресцентные маркеры и способы маркирования, используемые в биоанализе. Особое внимание уделено цианиновым (в частности, индоцианиновым) красителям и способам их получения. Рассмотрены методы синтеза индоленинов и производных малонового диальдегида, предшественников индодикарбоцианиновых красителей. Отдельная глава посвящена влиянию строения красителей на их спектральные свойства. Также представлены способы получения красителей с функциональными группами, пригодными для ковалентного маркирования биомолекул в водных растворах.

Результаты работы и их обсуждение.

Синтез и масс-спектрометрия олигонуклеотидов, несущих тиофосфорильные модификации заданной локализации.

Синтез олигонуклеотидов.

Наиболее экономичным в настоящее время является автоматический параллельный синтез олигонуклеотидов на многоканальных синтезаторах. Технические характеристики многих современных ДНК-синтезаторов, в том числе ASM800, предусматривают возможность проведения параллельного синтеза нескольких олигомерных последовательностей, а также независимое применение двух различных методов организации реакционного цикла в процессе элонгации каждой цепи. Однако при введении одного звена может применяться только один метод. Одновременная сборка полностью модифицированных олигонуклеотидов или последовательностей, несущих только концевые тиофосфаты в одинаковых позициях, не вызывает технических или программных затруднений. Различное для синтезируемых параллельно олигомеров чередование фосфотриэфирных и тиофосфорильных межнуклеотидных связей в заданной последовательности требует иной организации реакционных циклов.

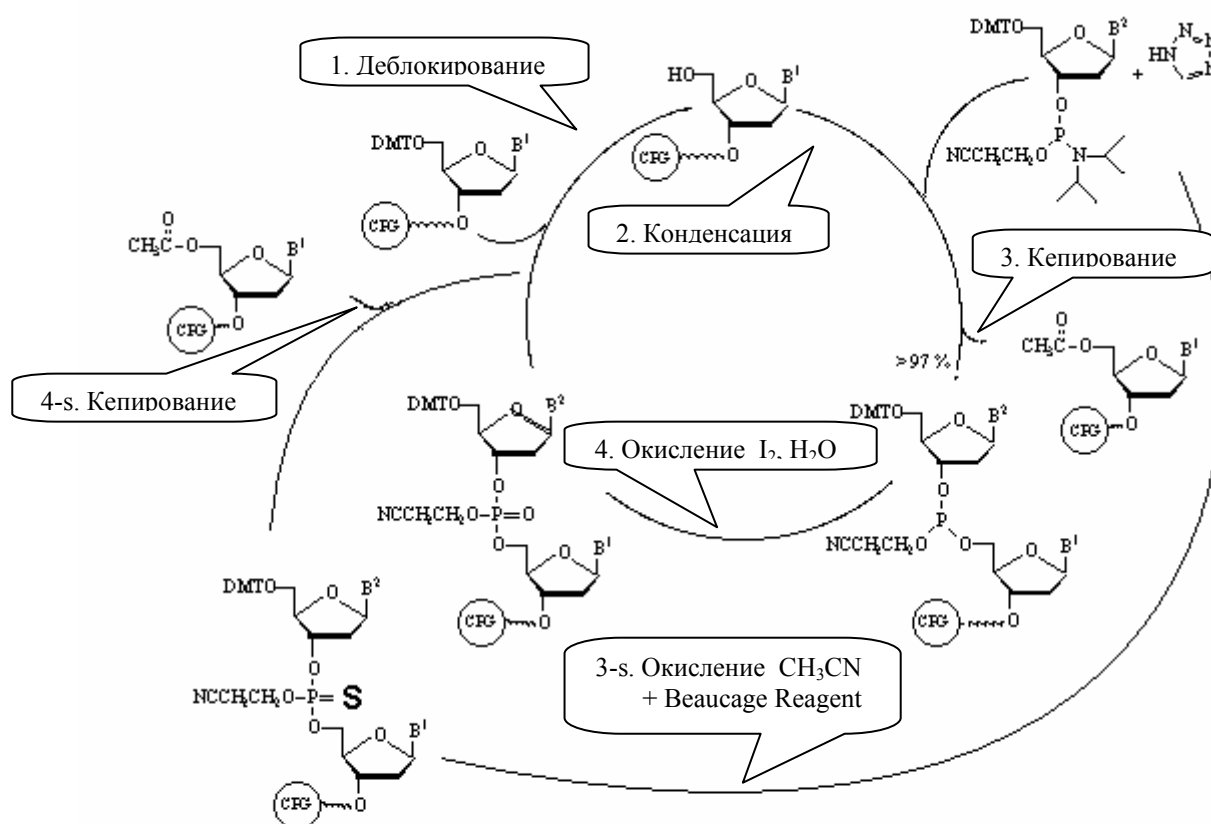
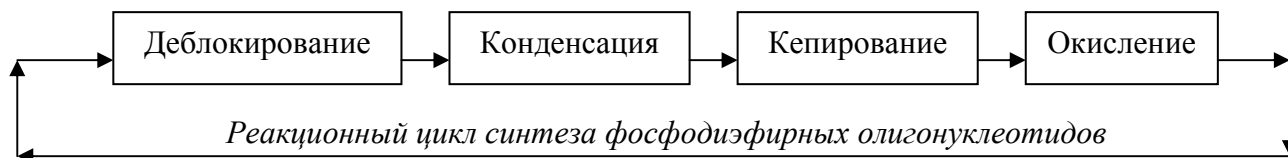


Рис 1. Реакционный цикл твердофазного синтеза олигонуклеотидов.

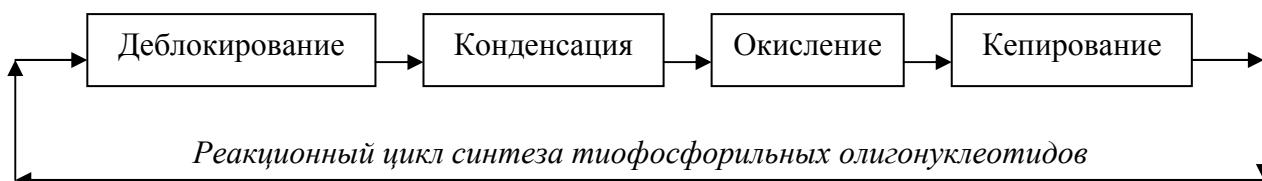
В настоящей работе синтез олигонуклеотидов осуществляли в традиционном реакционном цикле автоматического амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов. Метод организации реакционного цикла состоит из программных блоков, каждый из которых отвечает за осуществление основных стадий синтеза. Каждый блок включает в себя несколько десятков (вплоть до сотни) операций, представляющих собой, по сути, порядок переключения соответствующих клапанов синтезатора.



Для многоканальных ДНК-синтезаторов только стадия конденсации осуществляется отдельно для каждого нуклеотидного звена, а стадии деблокирования, кепирования и окисления проводятся параллельно для всех (в нашем случае 8) синтезируемых последовательностей.

В случае синтеза локально тиофосфорилированных олигонуклеотидов наиболее удобными и универсальными оказались два следующих подхода модификации программы. Для образования О,О,О-триэфиров тиофосфорной кислоты использовали стандартный реагент – свежеприготовленный раствор 3Н-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида в ацетонитриле.

1. **"Ждущий режим"**. В тех случаях, когда все (8 для ASM-800) одновременно синтезируемые олигонуклеотиды имеют не более 4-5 участков сульфурирования (независимо от их протяженности), введение в задаваемые нуклеотидные последовательности знаков «0» (ноль) позволяет задействовать в рамках одного параллельного синтеза две программы, отвечающих за образования фосфотриэфирных и тиофосфорильных межнуклеотидных связей соответственно. В случае введения тиофосфорильных звеньев стадию окисления проводили до кепирования, чтобы снизить вероятность образования фосфодиэфирных примесей:



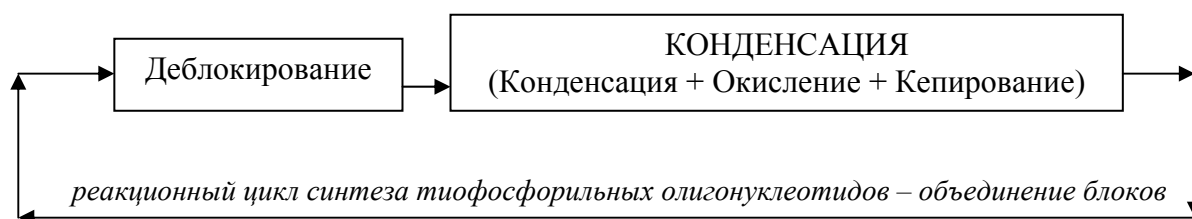
Таким образом, методы, отвечающие за образования фосфодиэфирных и тиофосфорильных межнуклеотидных связей, отличаются в данной работе порядком стадий кепирования и окисления, а также, соответственно, составом и линией подачи окислителя.

Следует отметить, что в силу аппаратно-программных особенностей ASM 800 параллельно синтезируемые последовательности должны нести одинаковые 5'-концевые межнуклеотидные связи. Поэтому, например, ряд аналогов ТВА 15 был синтезирован в виде двух серий:

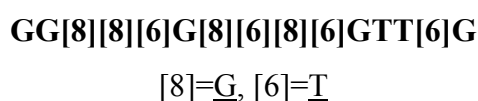
Наименование	Серия 1.
P111	<u>GG</u> TG <u>0</u> G <u>T</u> G <u>T</u> <u>GG</u> T <u>G</u> <u>0</u> G
P4	G <u>0</u> G <u>T</u> T <u>GG</u> T <u>G</u> <u>0</u> G <u>T</u> T <u>GG</u>
STBA15	<u>GG</u> T <u>T</u> <u>GG</u> T <u>G</u> <u>T</u> <u>GG</u> <u>0000</u> <u>T</u> <u>0000</u> <u>T</u> <u>0000</u> <u>GG</u>
	Серия 2.
L1	GGT <u>0000</u> TGG <u>0000</u> TGTGG <u>00</u> <u>T</u> <u>00</u> TGG
L11	GG <u>00</u> <u>T</u> <u>0</u> TGG <u>0000</u> TGTGG <u>00</u> <u>T</u> <u>00</u> TGG
L121	GG <u>00</u> <u>T</u> <u>0</u> TGG <u>00</u> <u>TG</u> <u>00</u> TGG <u>00</u> <u>T</u> <u>00</u> TGG
L343	GG <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>000</u> G <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>0000</u> G <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>0000</u> G
L3	GG <u>0</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>000</u> G <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u>
P1415	GGT <u>000</u> GGT <u>G</u> <u>0000</u> TGGT <u>00</u> <u>G</u> <u>0000</u> G
P1011	GGT <u>0000</u> GGT <u>G</u> <u>T</u> <u>00</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u>
P511	GGT <u>000</u> <u>G</u> <u>0</u> G <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>00</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u>

0 - пропуск текущего цикла; - блоки с использованием программы введения тиофосфорильной межнуклеотидной связи; подчеркнуты 3'-модифицированные звенья.

2. При введении более 4-5 участков тиофосфорильных связей в состав олигомеров, для каждого нуклеотидного звена создается по 2 протокола, причем обычно отдельные программные блоки кепирования и окисления прописываются в блоке конденсации:



Таким образом, последовательность задается не 4, а 8 знаками. Тогда последовательность GGGGTGGTGTGTTTG, где подчеркнуты 3'-тиофосфорильные звенья, соответствует записи:



при этом только стадия деблокирования остается параллельной для всех вводимых звеньев. Такой прием позволяет вводить неограниченное количество межнуклеотидных

тиомодификаций, что компенсирует увеличение в 2-3 раза временных затрат и расходов реактивов.

Выходы стандартно деблокированных и очищенных олигомеров при прочих равных условиях синтеза не зависели от режима их сборки. Выбор стратегии синтеза частично тиомодифицированных олигонуклеотидов в пользу одного из приведенных выше подходов или их комбинации определяется конкретной задачей и составом синтезируемых олигонуклеотидов.

Масс-спектрометрия.

Лазерная десорбционно-ионизационная масс-спектрометрия с участием матрицы (MALDI MS) стала одним из наиболее распространенных и информативных методов анализа структуры олигонуклеотидов, в том числе содержащих различные модификации и концевые производные. В литературе приводятся сведения о MALDI MS олигонуклеотидов, несущих только 1-2 тиофосфорильные концевые модификации. Наши попытки получить масс-спектры синтезированных тиоаналогов олигонуклеотидов с хорошим разрешением в соответствии со стандартным протоколом не увенчались успехом. В связи с этим был проведен анализ влияния условий приготовления рабочего раствора матрицы – 3-гидроксипиколиновой кислоты, способа нанесения образца и ряда других параметров. Эксперименты по оптимизации проводились с использованием фосфодиэфирного олигомера состава 5-TTGACATTCGCAACCTCGC-3, концентрации олигонуклеотида варьировали в пределах 5-1000 фмоль/мкл, с соотношением матрица/образец равным 2:1 (0,4:0,2 мкл). Масс-спектры получали на MALDI-времяпролетных масс-спектрометрах UltraFlex и MicroFlex (Bruker, Германия), оснащенных УФ-лазерами (Nd, 354 нм и N₂, 337 нм, соответственно), с использованием стандартной мишени – MSP target polished steel (Bruker, Германия). Масс-спектры получены в линейном режиме, детектировались положительные ионы; точность измеренных масс составляла 0,1%.

Оказалось, что существенное влияние на качество масс-спектров оказывает использование для приготовления матрицы разных сочетаний растворителей (воды и ацетонитрила) различных градаций и производителей. Качественные масс-спектры разбавленного образца олигонуклеотида (50 фмоль/мкл, сигнал/шум 100:1) позволяли получать 5 из 12 опробованных вариантов, и только 3 из них (1. Вода LC-MS (Sigma)– ацетонитрил for mass spectrometry (Fluka), 2. Вода LC-MS (Sigma)– ацетонитрил for spectroscopy (Merck), 3. Вода Hiperpur-plus (Panreac) - ацетонитрил Hiperpur (Panreac)) давали удовлетворительные результаты для раствора с концентрацией 20 фмоль/мкл (сигнал/шум, 10:1). Следует отметить, что изменение продолжительности выдержки при кристаллизации матрицы (10 - 45 мин) практически не влияло на результаты.

Удачным приемом оказалось добавление ацетонитрила в водный раствор образца, что позволило получать воспроизводимую картину кристаллизации с характерным видом кристаллов (Рис.1), повысить равномерность распределения образца и интенсивность пиков в спектрах, улучшить их разрешение. Так, в оптимизированных условиях удалось получить спектры с соотношением сигнал/шум, 5:1 даже для 5 pM раствора ТВА15 (1 фмоль в пробе), что является пределом чувствительности для MALDI-TOF масс-спектрометра MicroFlex.

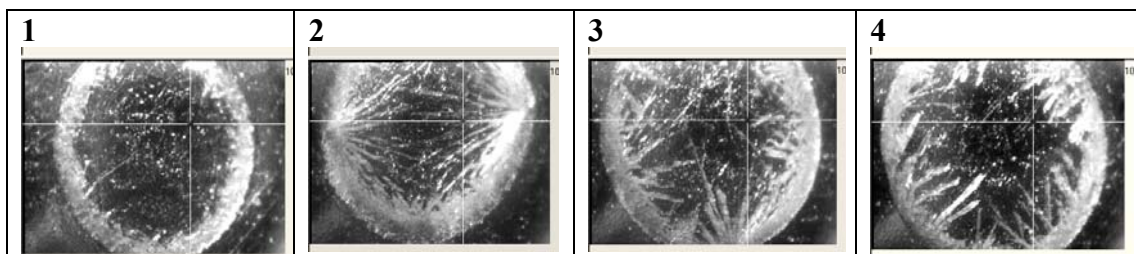


Рис.2. Характерный вид мишени (MSP target polished steel) с пробой при нанесении олигонуклеотида на 3-гидроксипиколиновую матрицу в виде раствора в воде (1) и в воде в присутствии 20 (2), 40 (3) и 60% (4) ацетонитрила. Масс-спектрометр – MicroFlex.

Найденные приемы подготовки матрицы и нанесения образцов олигонуклеотидов позволили получать достоверные и воспроизводимые масс-спектры тиофосфорильных олигонуклеотидов, с соотношением сигнал/шум 50:1 и преобладающим интенсивным сигналом пика молекулярного иона. Характерные примеры спектров, полученных на спектрометре MicroFlex, приведены на Рис. 3.

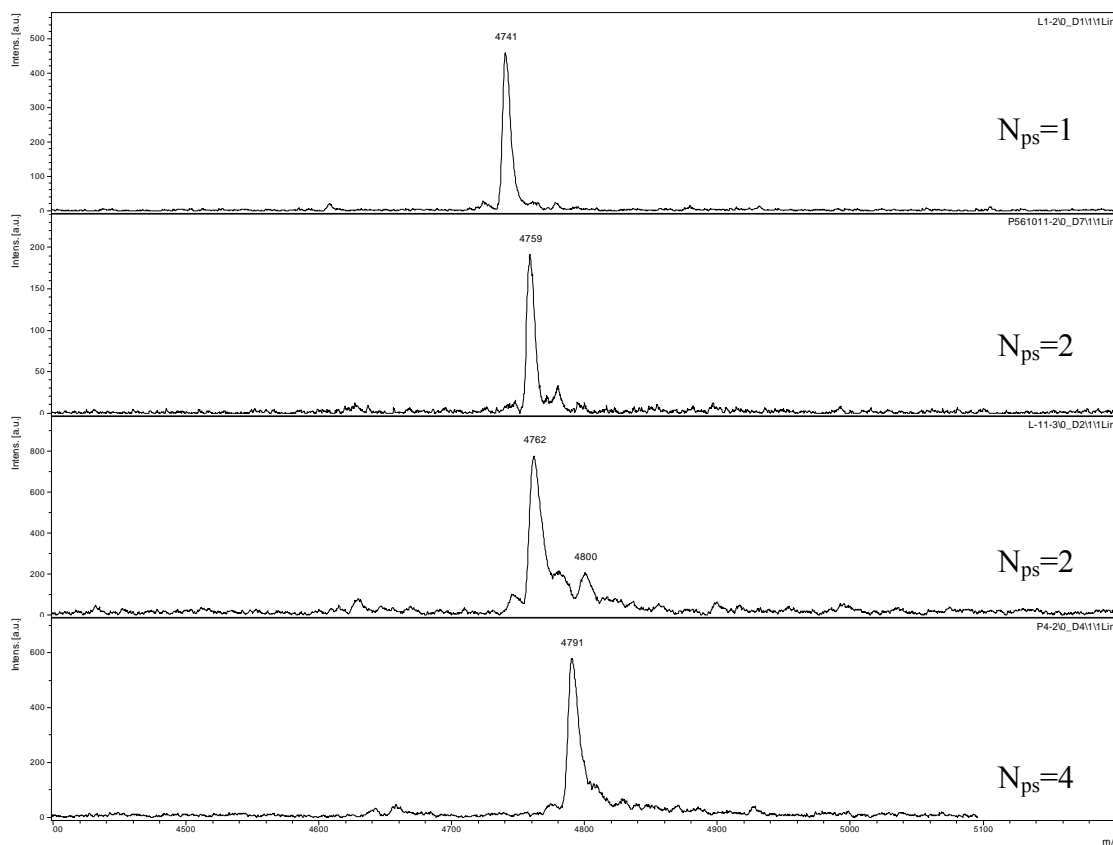


Рис.3. Масс-спектры олигонуклеотидов L1, L11, P4 и P561011 (тио-аналоги олигомера $d(\text{GGTTGGTGTGGTTGG})$) с различным количеством PS-связей (N_{ps}).

На основании полученных данных легко рассчитывается содержание атомов серы (N) в молекуле олигонуклеотида из разницы найденной молекулярной массы и рассчитанной для соответствующего фосфодиэфирного олигомера. Результаты расчетов с высокой точностью подтверждают состав синтезированных последовательностей.

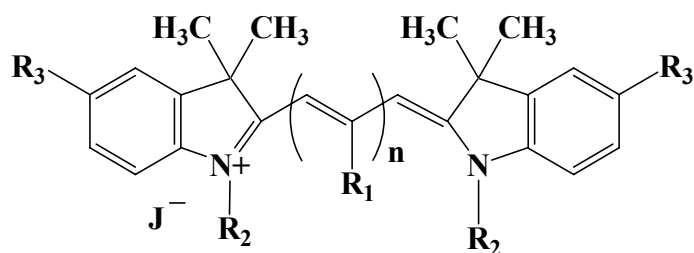
Синтез модифицированных индодикарбоцианиновых красителей для маркирования олигонуклеотидов.

За последние 10 лет флуоресцентное маркирование стало одним из ключевых методов детекции в научных исследованиях и медицинской практике. Высокая чувствительность систем детекции, основанных на флуоресцентном маркировании дает возможность минимизировать форматы биофизических исследований, а также существенно снизить экономические затраты. Так, для технологии биологических микрочипов в последние годы активно разрабатываются портативные анализаторы изображений с использованием недорогих промышленных лазеров. Например, в Институте Молекулярной Биологии им. В.А. Энгельгардта РАН были созданы портативные флуоресцентные анализаторы изображений микрочипов с полупроводниковыми лазерными источниками света с $\lambda=650$ нм и фильтром пропускания $\lambda > 680$ нм, и с $\lambda=635$ нм и фильтром пропускания $\lambda > 680$ нм соответственно. Для достижения высокой чувствительности анализа для каждого анализатора изображений подбирается свой оптимальный флуорофор.

Пригодность флуорофора для применения в системах детекции определяется его фотофизическими (спектральными) характеристиками и химической совместимостью с соответствующим биологическим материалом. Кроме того, большое значение имеют стабильность флуорофора в условиях маркирования, растворимость в водных растворах и минимальное воздействие на биологическую активность маркируемых молекул.

Для маркирования биомолекул обычно применяют активированные эфиры красителей: гидроксисукцинимидный, пентафторфениловый, пара-нитрофениловый и др. Маркирование происходит по первичным amino- или тио-группам.

В качестве флуорофоров для маркирования биомолекул широко используются индоцианиновые красители:



Спектральные характеристики этих соединений напрямую зависят от длины полиметиновой цепи, соединяющей ароматические системы. Как правило, максимумы возбуждения и испускания смещаются в красную область на 100 нм с каждым увеличением n на единицу. Спектральные характеристики красителей с $n=0$ соответствуют спектральным характеристикам аргонно-ионных лазеров (~488 нм), с $n=1$ – гелий-ионных лазеров (~543 нм), с $n=3$ – гелий-неоновых лазеров (~633 нм). Красители с $n=2$ и $n=3$ имеют высокие квантовые выходы. Кроме того, фотофизические свойства индоцианиновых красителей напрямую зависят от заместителей в бензольном кольце. Использование в качестве заместителя в гетероциклической системе сульфо-группы позволяет не только повысить растворимость в воде, но и увеличить квантовый выход флуоресценции.

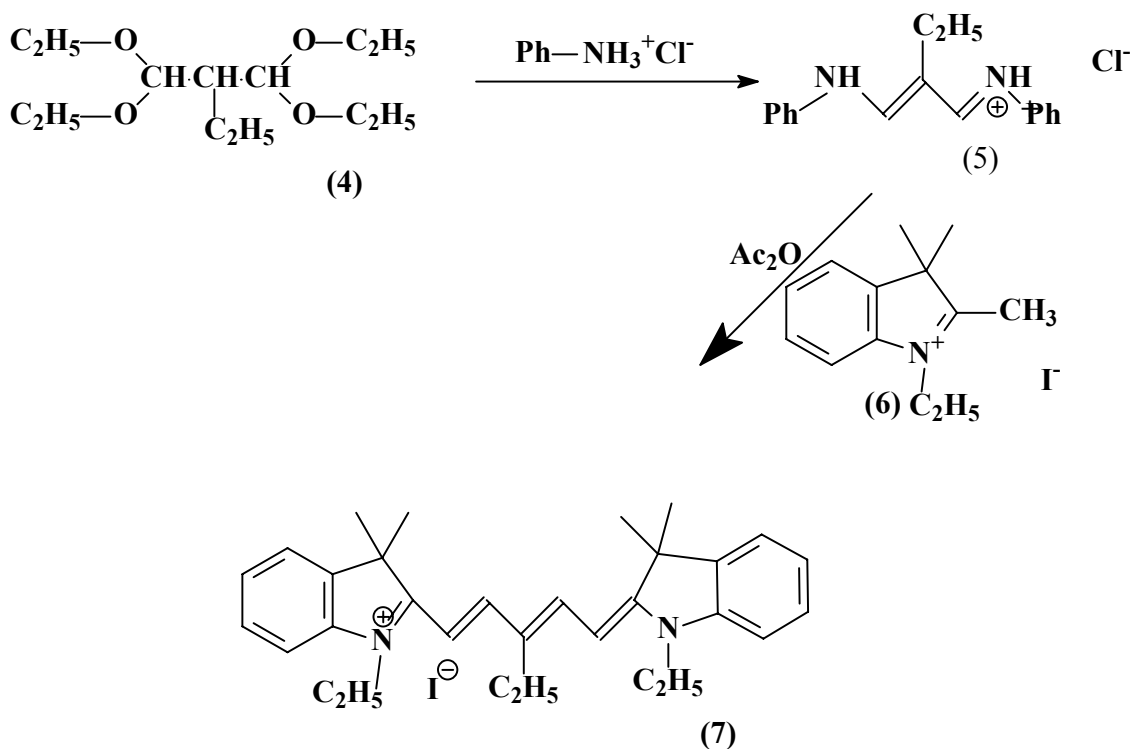
Синтез индодикарбоцианиновых красителей основан на реакции конденсации солей индолениния, содержащих активную метиленовую группу и соответствующего дианила малонового диальдегида. Соли индолениния получают из индоленинов введением N-заместителей.

Предложенные нами модификации состояли во введении алкильных заместителей в бензольное кольцо и в полиметиновую цепь, а также во введении заместителя, содержащего сульфо-группу в положение при атоме азота.

Йодид [5-(1-этил-3,3-диметилиндолин-2-илиден)-3-этил-1,3-пентадиен-1-ил]-1-этил-3,3-диметилиндоленения.

Согласно литературным данным, на спектральные свойства цианиновых красителей большое влияние оказывает наличие и природа заместителей в полиметиновой цепи. Так, присутствие при среднем углеродном атоме электронодонорных групп вызывает гипсохромный сдвиг. Наоборот, присутствие электроноакцепторных заместителей вызывает углубление окраски. Однако именно для индодикарбоцианиновых красителей таких данных в литературе мы не обнаружили. Тем не менее, для сдвига максимумов поглощения и флуоресценции целевого индодикарбоцианинового красителя в более коротковолновую область по сравнению с коммерческим красителем Су5, было принято решение ввести в положение при среднем углеродном атоме полиметиновой цепи этильный заместитель. Т.к. синтез цианиновых красителей обычно основан на последовательных конденсациях соответствующих солей индолениния с дианилом малонового диальдегида, и образовавшегося промежуточного продукта – с другой соответствующей индолениниевой солью, то модификации следовало подвергать дианил. Была предложена и осуществлена следующая схема синтеза (Схема 1)

Схема 1.



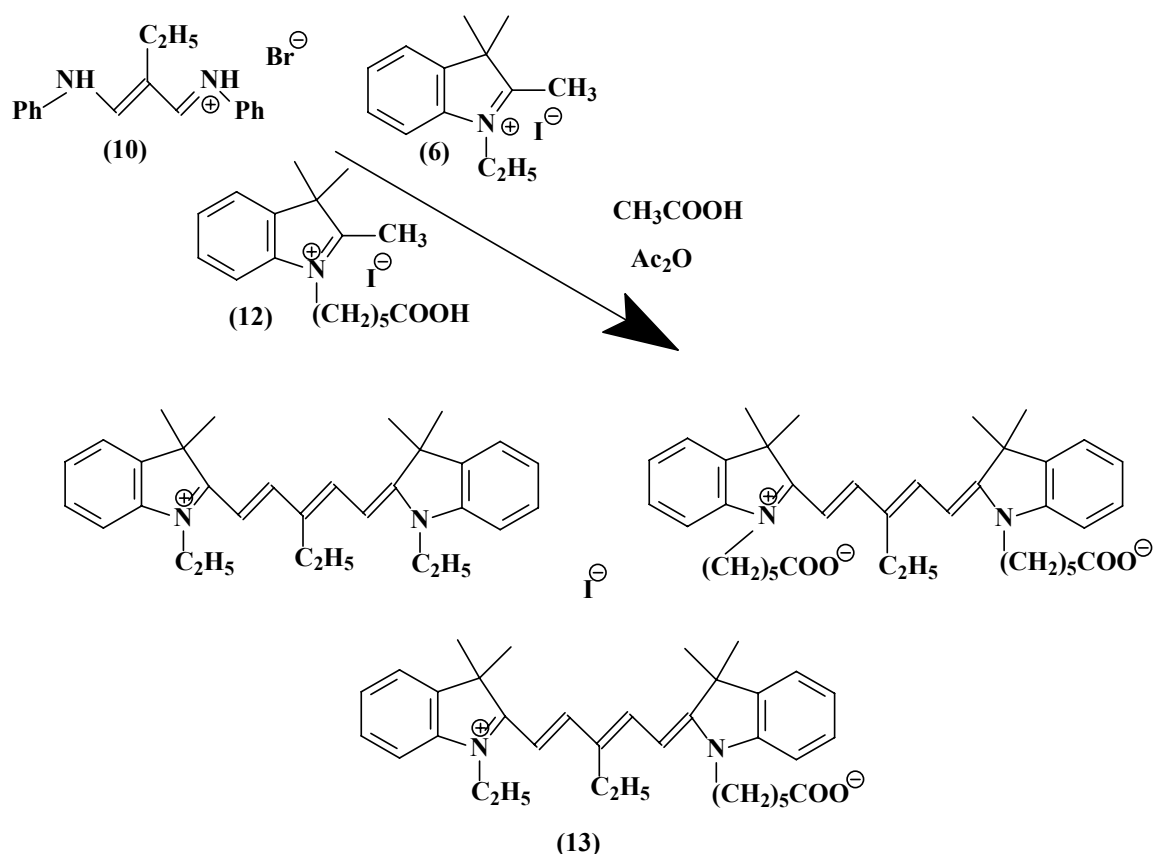
Тетраэтилацеталь 2-этилмалонового диальдегида (4) получали в несколько стадий из масляного альдегида согласно литературной методике (Яновская Л.А., Юфит С.С. и др.). Затем получали хлоридрат дианила 2-этилмалонового диальдегида (5) путем смешивания хлоридрата анилина, метанола и тетраэтилацетала 2-этилмалонового диальдегида при нагревании до 50°C, дальнейшего растирания реакционной смеси при охлаждении на ледяной бане и переосаждения водой из этилового спирта. Строение промежуточных соединений было подтверждено с помощью MALDI масс-спектрометрии, электронной спектроскопии поглощения и спектроскопии ЯМР ^1H . Индодикарбоцианиновый краситель (7) получали взаимодействием хлоридрата дианила 2-этилмалонового диальдегида (5) и N-этил-2,3,3-триметил-индоленина (6) в уксусном ангидриде при комнатной температуре. Продукт выделяли в смеси изопропанола и сухого диэтилового эфира. Целевое вещество отделяли от примесей на хроматографической колонке, заполненной силикагелем, в элюирующей системе растворителей бензол:метанол:триэтиламин 5:1:0,2. Полученный краситель охарактеризовывали с помощью MALDI масс-спектрометрии. Также были получены спектры поглощения и флуоресценции. Спектр поглощения показал одну узкую полосу поглощения с максимумом на 635 нм, что и являлось нашей целью. Спектр флуоресценции представлял собой узкую полосу – зеркальное отражение спектра поглощения со стоксовым сдвигом в 15 нм. Таким образом, полученное соединение (7) обладает спектральными характеристиками индодикарбоцианинового красителя.

2-[5-(1-этил-3,3-диметилиндолин-2-илиден)-3-этил-1,3-пентадиен-1-ил]-1-карбоксопентил-3,3-диметилиндолениний

Т.к. полученный индодикарбоцианиновый краситель (7) обладает нужными нам спектральными характеристиками, было принято решение синтезировать краситель с этильным заместителем при среднем атоме углерода полиметиновой цепи и заместителем, содержащем функциональную (карбоксильную) группу, при атоме азота (Схема 2.). Якорная группа нужна для дальнейшего получения активированного эфира цианинового красителя, для возможности маркирования биополимеров по первичным аминогруппам. Оказалось, что замена противоиона (Cl на Br) значительно облегчает протекание реакций получения дианила 2-этилмалонового диальдегида и его выделение.

Строение промежуточных соединений было подтверждено с помощью физико-химических методов анализа.

Схема 2.



Затем получали 2-[5-(1-этил-3,3-диметилиндолин-2-илиден)-3-этил-1,3-пентадиен-1-ил]-1-карбоксопентил-3,3-диметилиндолениний (13) в две стадии: 1. взаимодействие N-этил-2,3,3-триметилиндоленина (6) и дианила этилмалонового диальдегида (10) в смеси уксусной кислоты и уксусного ангидрида. 2. После удаления уксусной кислоты, промежуточный продукт взаимодействовал с N-карбоксопентил-2,3,3-триметилиндоленинем (12) в уксусном

ангидриде. Целевое соединение (13) отделяли от смеси продуктов хроматографией на силикагеле, используя системы растворителей, содержащие дихлорметан, бензол, метанол и триэтиламин. Качество разделения контролировали методом ТСХ.

Полученный краситель охарактеризовывали с помощью MALDI масс-спектрометрии. Также были получены спектры поглощения и флуоресценции. Спектрально-люминесцентные свойства соединения (13) оказались аналогичны свойствам соединения (7), т.к. изменения в строении не затронули хромофорную группу.

Йодид 2-[5-(1-этил-3,3,5-триметилиндолин-2-илиден)-1,3-пентадиен-1-ил]-1-этил-3,3,5-триметилиндоления.

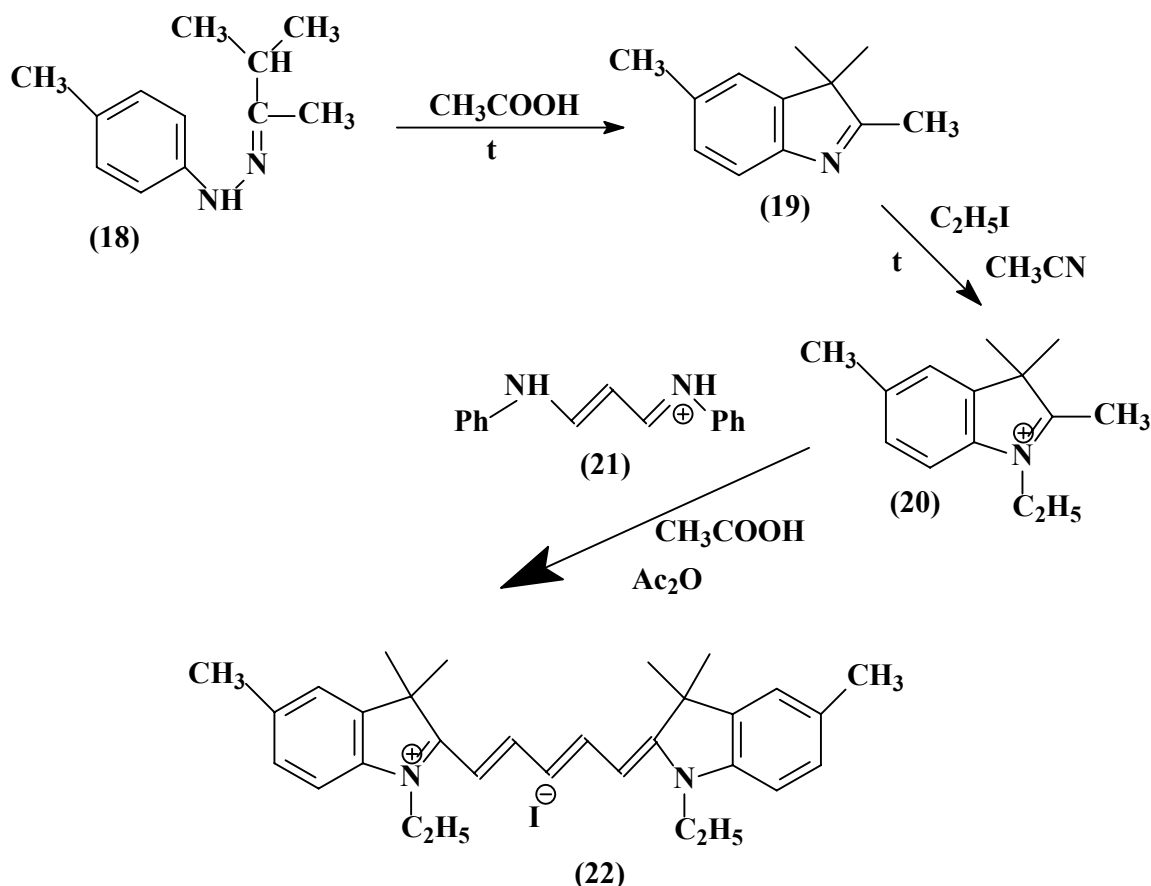
Согласно литературным данным, большое влияние на поглощение цианинов оказывают заместители, входящие в состав гетероциклических остатков. Электронодонорные группы в положении 4 к атомам азота гетероостатков вызывают батохромный сдвиг. Электроноакцепторные группы в том же положении также оказывают батохромный эффект, но более слабый, либо небольшой гипсохромный сдвиг. Заместители в орто-положении к атомам азота гетероостатков, также как и заместители при атомах азота, оказывают незначительное влияние на спектральные свойства цианинов.

Таким образом, для сдвига максимумов поглощения и флуоресценции целевого индодикарбоцианинового красителя в более длинноволновую область по сравнению с коммерческим красителем Су5, было принято решение ввести метильный радикал в положение 4 к атомам азота гетероостатков Су5. Соответственно, модификации должны были подвергнуться соли индоления. Была предложена и осуществлена следующая схема синтеза – Схема 3.

n-Толилгидразон изопропилметилкетона (18) получали в несколько стадий из *n*-нитротолуола (14) согласно методикам (Jackson A.H.; Агрономов А.Е.; Southwich P.L.)

2,3,3,5-тетраметилиндоленин (19) получали двумя разными способами. 1 способом 2,3,3,5-тетраметилиндоленин (19) получали из синтезированного ранее *n*-толилгидразона изопропилметилкетона (18) реакцией Фишера. Целевой продукт выделяли перегонкой в вакууме водоструйного насоса в атмосфере азота при $T_{кип}=125^{\circ}\text{C}/8$ мм рт. ст.

2 способом 2,3,3,5-тетраметилиндоленин (19) получали из синтезированного ранее *n*-толилгидразина гидрохлорида (16) без выделения *n*-толилгидразона изопропилметилкетона (18) - взаимодействием метил-изопропилкетона (17), *n*-толилгидразина гидрохлорида (16) и ацетата калия в ледяной уксусной кислоте. Продукт также выделяли вакуумной перегонкой в токе азота.



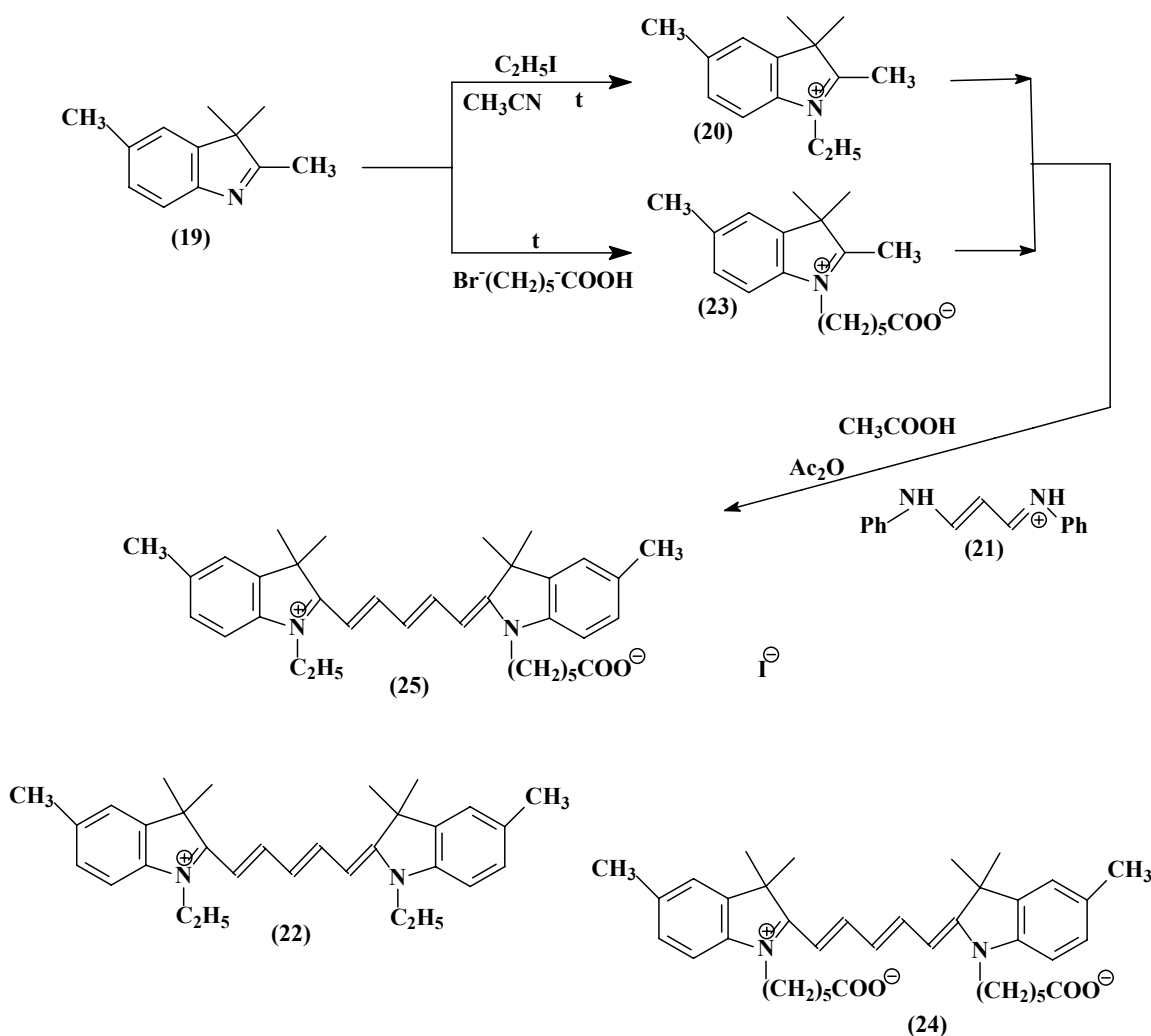
При сравнении способов I и II можно сделать вывод, что для получения 2,3,3,5-тетраметилиндолина (19) оптимальным является метод II, т.к. позволяет существенно повысить выход целевого продукта и проводить синтез в одну стадию.

Далее взаимодействием 2,3,3,5-тетраметилиндолина (19) с йодистым этилом получали N-этил-2,3,3,5-тетраметилиндолин (20). Строение промежуточных соединений было подтверждено с помощью MALDI масс-спектрометрии, электронной спектроскопии поглощения и спектроскопии ЯМР ^1H . Индодикарбоцианиновый краситель (22) получали взаимодействием дианила малонового диальдегида (21) и N-этил-2,3,3,5-тетраметилиндолина (20) в уксусном ангидриде. Целевое вещество отделяли от примесей на хроматографической колонке, заполненной силикагелем, в элюирующей системе растворителей бензол:метанол:триэтиламин = 5:1:0,2. Полученный краситель охарактеризовывали с помощью MALDI масс-спектрометрии. Также были получены спектры поглощения и флуоресценции. Электронный спектр поглощения показал одну узкую полосу поглощения с максимумом на 648 нм. Спектр флуоресценции представлял собой узкую полосу – зеркальное отражение спектра поглощения со стоксовым сдвигом в 20 нм. Таким образом, полученное соединение (22) обладает спектральными характеристиками индодикарбоцианинового красителя.

2-[5-(1-этил-3,3,5-триметилиндолин-2-илиден)-1,3-пентадиен-1-ил]-1-карбокспентил-3,3,5-триметилиндолениний.

Полученный индодикарбоцианиновый краситель (22) обладает искомыми спектральными характеристиками. Далее для получения соли индоленения с функциональной группой при атоме азота проводили реакцию конденсации 2,3,3,5-тетраметилиндоленина (19) с 6-бромкапроновой кислотой (Схема 4.). Структура полученного соединения (23) была подтверждена с помощью MALDI масс-спектрометрии, электронной спектроскопии поглощения и спектроскопии ЯМР ^1H .

Схема 4.



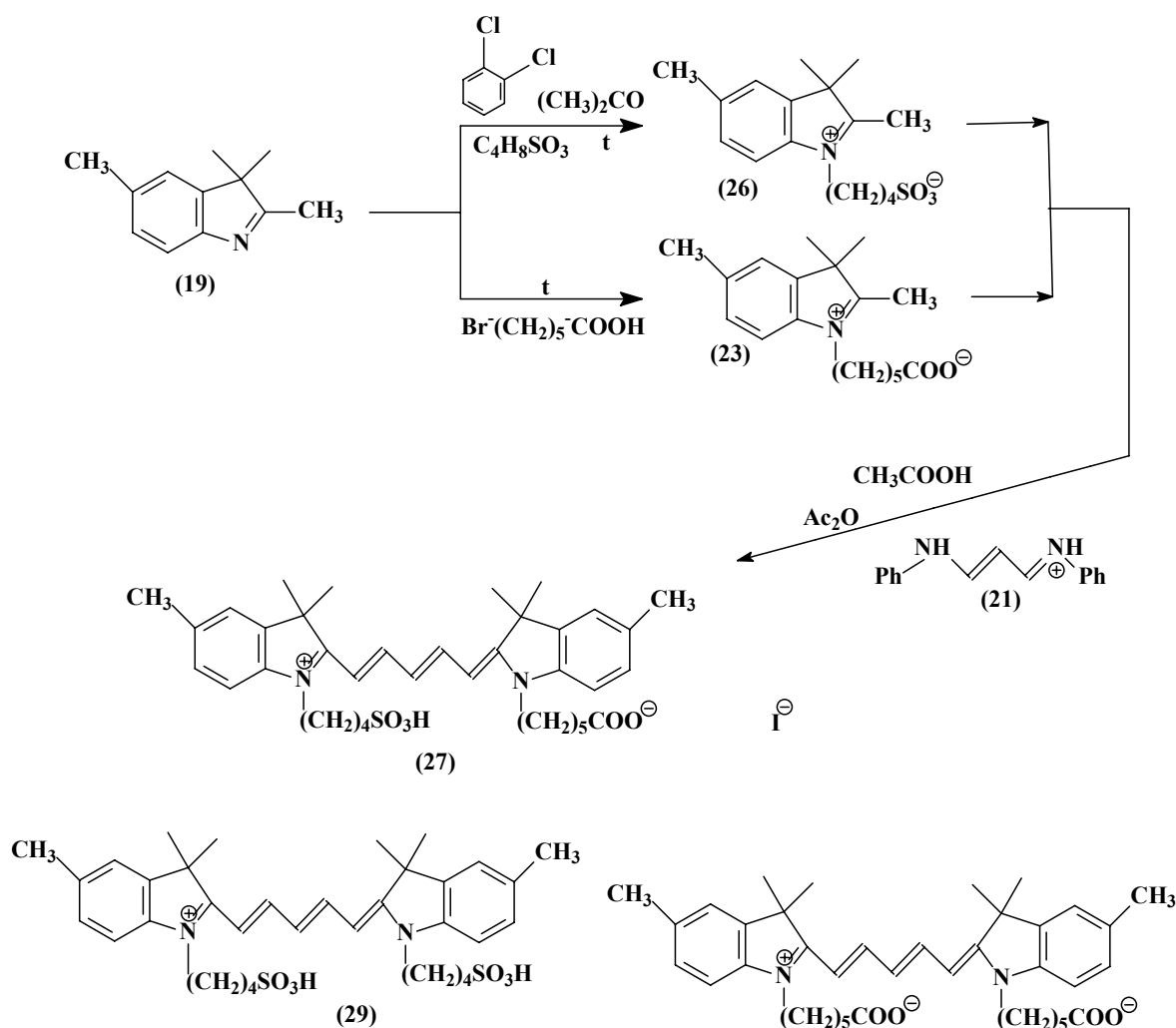
Получение индодикарбоцианинового красителя (25) осуществляли в две стадии: 1. взаимодействие N-этил-2,3,3,5-тетраметилиндолинина (20) и дианила малонового диальдегида (10) в смеси уксусной кислоты и уксусного ангидрида. 2. После удаления уксусной кислоты, промежуточный продукт взаимодействовал с N-карбокспентил-2,3,3,5-тетраметилиндолинином (23) в уксусном ангидриде. Целевое соединение (25) отделяли от смеси продуктов на хроматографической колонке, заполненной силикагелем, в элюирующей системе растворителей бензол:метанол:триэтиламин 5,5:0,5:0,2 (1 фракция) и

бензол:метанол:триэтиламин 4,5:1,5:0,2 (2 фракция – целевой продукт). Качество разделения контролировали методом ТСХ. Полученный краситель охарактеризовывали с помощью MALDI масс-спектрометрии. Также были получены спектры поглощения и флуоресценции. Спектрально-люминесцентные свойства соединения (25) аналогичны свойствам соединения (22), т.к. изменения в строении не затронули хромофорную группу.

2-[5-(1-карбокспентил-3,3,5-триметилиндолин-2-илиден)-1,3-пентадиен-1-ил]-1-сульфобутил-3,3,5-триметилиндолениний.

Для увеличения растворимости в воде индодикарбоцианинового красителя (25) было принято решение ввести во второй гетероциклический остаток сульфо-группу при атоме азота (Схема 5). Для этого проводили реакцию конденсации 2,3,3,5-тетраметилиндоленина (19) с 1,4-бутилсультоном в 1,2-дихлорбензоле. Стратегией реакции явилась комбинация двух различных методик (*Southwich P.L. и Ratnakar B Mujumdar*). Полученный N-сульфобутил-2,3,3,5-тетраметил-индоленин (26) охарактеризовывали с помощью MALDI масс-спектрометрии и электронной спектроскопией поглощения.

Схема 5.



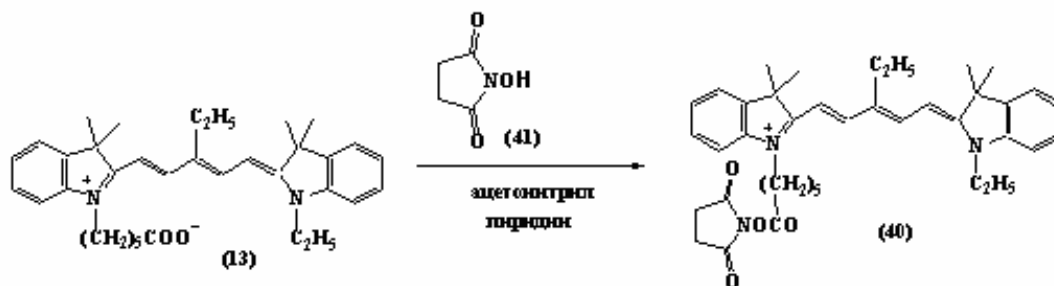
Индодикарбоцианиновый краситель (27) получали в две стадии: 1. взаимодействие дианила малонового диальдегида (21) и N-сульфобутил-2,3,3,5-тетраметилиндолинина (26) в уксусном ангидриде. 2. Затем промежуточный продукт реагировал с N-карбоксивентил-2,3,3,5-тетраметилиндолинином (23) в смеси уксусного ангидрида и ледяной уксусной кислоты. Целевой продукт реакции (27) выделяли на хроматографической колонке (RP-18) в градиенте концентраций от А до В, где А – это система вода:ацетонитрил= 3:1, В – вода:ацетонитрил = 1:4. Качество разделения контролировали с помощью ТСХ на RP-18 (система растворителей: вода:ацетонитрил = 1:4).

Полученный краситель охарактеризовывали с помощью MALDI масс-спектрометрии и электронной спектроскопии поглощения. Спектрально-люминесцентные свойства соединения (27) аналогичны свойствам соединения (22), т.к. изменения в строении не затронули хромофорную группу.

Активация карбоксилсодержащих модифицированных цианиновых красителей и маркирование олигонуклеотидов.

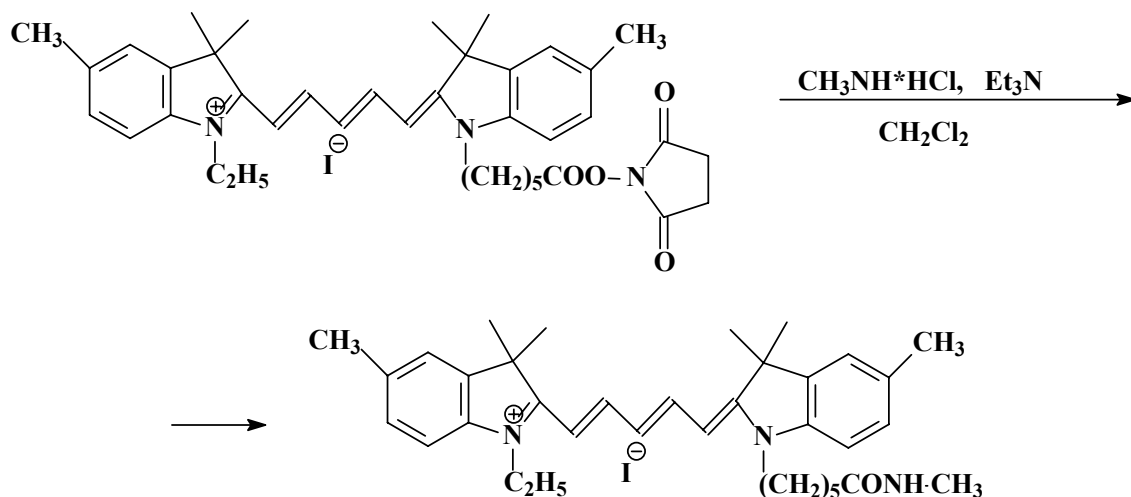
Активацию карбоксильных групп в составе красителей (13, 25, 27) проводили по однотипной методике: к раствору карбоксильного компонента (13, 25, 27) в безводном ацетонитриле в присутствии пиридина добавляли N-гидроксисукцинимид (41) (Схема 6.).

Схема 6.



Продукт выделяли в техническом виде, т.к. при очистке хроматографическим методом он гидролизует на силикагеле.

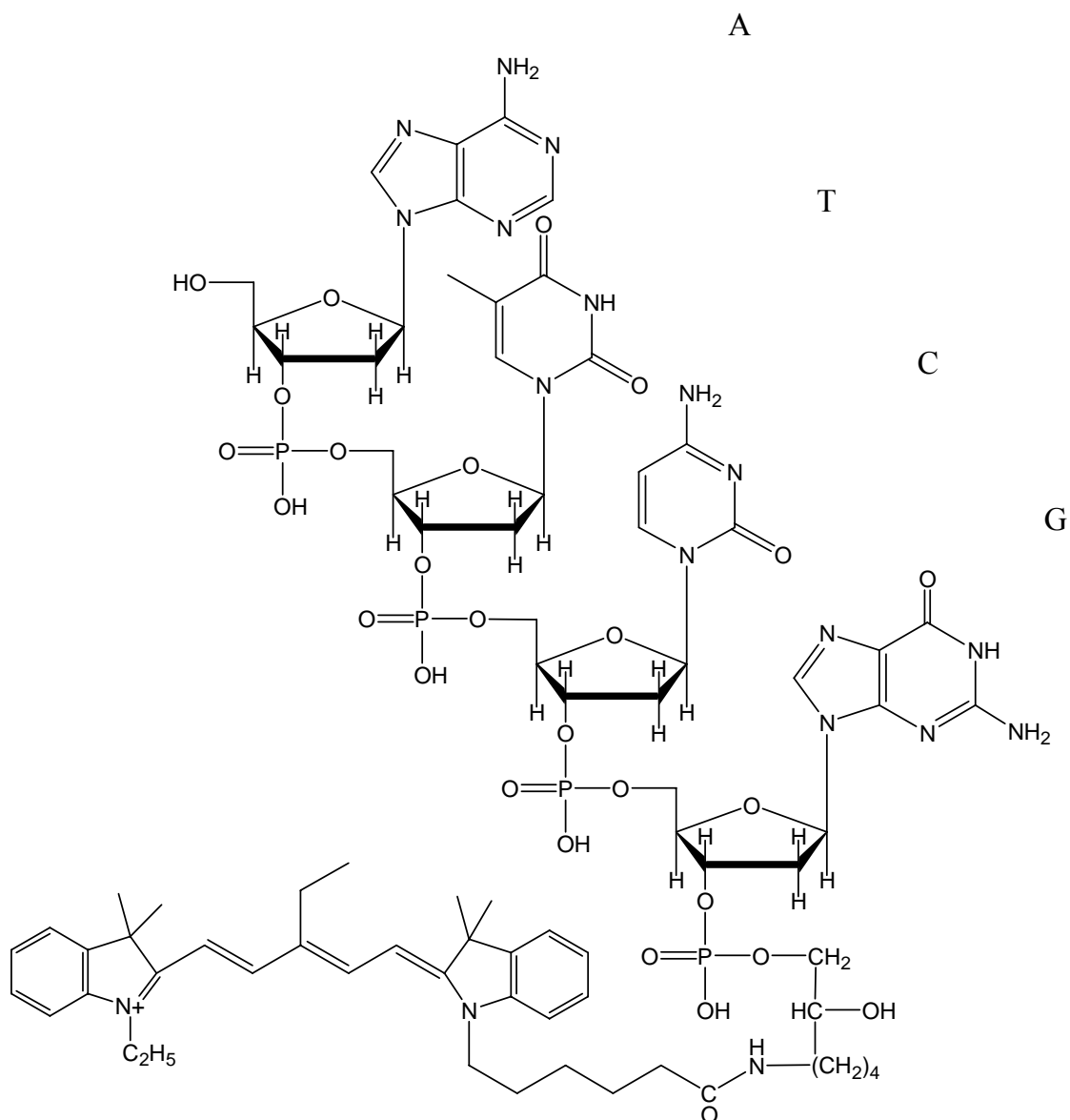
Получение целевого продукта подтверждали качественной реакцией с CH_3NH^*HCl :



Ход реакции контролировали с помощью ТСХ. Соединение охарактеризовывали с помощью MALDI масс-спектрометрии.

Строение соединения подтверждалось также способностью взаимодействовать с синтетическим аминокислотным олигонуклеотидом. К охлажденному раствору олигонуклеотида (состава 5'-СТС·AGT·ТС-С₆NH₂-3') в карбонат-бикарбонатном буфере добавляли раствор активированного красителя в пиридине. Затем в реакционную массу добавляли равные объемы триэтиламмоний-ацетатного буфера и *n*-бутанола, центрифугировали и отбирали супернатант. Из супернатанта избыток красителя экстрагировали *n*-бутанолом. Маркированный олигонуклеотид выделяли с помощью HPLC (сорбент Hypersil C-18, 5 мкм, детекция при 254 нм, градиентное элюирование от 20% до 100% "В" за 30 мин, где "В" – 50%-ный раствор ацетонитрила в "А", "А" – 0,1М ТЕАА). Используемый олигонуклеотид с M.W.2555, окрашенный красителем (13) имеет расчетную молекулярную массу 3063. Найдено M.W.3067, - MALDI масс-спектрометрически.

Олигонуклеотиды, маркированные красителями (13) и (25) были выделены HPLC с выходами порядка 65–70%. Молекулярные массы полученных конъюгатов были подтверждены с помощью MALDI масс-спектрометрического анализа. Были сняты спектры поглощения флуоресценции олигонуклеотидов, маркированных этими красителями. Оказалось, что эти спектры совпадают со спектрами (13) и (25). Из этого следует, что между красителем и олигонуклеотидом нет взаимодействий, которые приводили бы к существенным изменениям спектральных характеристик, что является необходимым для дальнейшего использования этих веществ в качестве флуоресцентных меток.



При проведении гибридизационного анализа с использованием полученных красителей были получены следующие результаты (лазерный источник света 650 нм). Красители могут использоваться в гибридизационном анализе нуклеиновых кислот. Предельная чувствительность регистрации красителей на биологическом микрочипе достигала примерно 1 аттомоль (10^{-18} моль, или 10^6 молекул). Также было установлено, что дискриминация результатов гибридизационного анализа при использовании красителя (25) была несколько лучше, чем при использовании красителя (13).

Одновременно с данными красителями испытывался краситель, содержащий сульфогруппу в положении при атоме азота (соединение (27)). Оказалось, что дискриминация результатов анализа при использовании этого красителя была наилучшей.

Выводы.

1. Разработаны приемы автоматического параллельного синтеза олигонуклеотидов, несущих различные локальные тиофосфорильные межнуклеотидные связи, с использованием сборки олигонуклеотидов в «ждущем режиме» и с созданием специальных программных блоков. Найденные схемы организации реакционных циклов могут быть успешно применены в работе современных синтезаторов.
2. Продемонстрирована эффективность предложенных методов сборки олигомеров на примере параллельного синтеза и получения высокоочищенных (по данным ВЭЖХ-анализа и электрофореза в ПААГ), несущих заданное количество модификаций тиоаналогов биологически значимых олигонуклеотидов, что позволит широко применять частично модифицированные олигонуклеотиды как молекулярно-биологические исследовательские инструменты и диагностикумы, а также для поиска новых олигонуклеотидных лекарственных средств.
3. Оптимизированы условия анализа олигонуклеотидов с помощью MALDI TOF масс-спектрометрии, позволившие повысить чувствительность метода и получать достоверные характеристики тиофосфорильных аналогов олигонуклеотидов, надежно подтверждающие наличие заданного числа тиофосфорильных связей в составе целевых синтетических последовательностей.
4. Синтезированы, выделены и охарактеризованы 5 аналогов коммерческого индодикарбоцианинового красителя Су5, содержащих различные заместители: а) в полиметиновой цепи б) в бензольном кольце в) при атоме азота. Строение промежуточных соединений подтверждено с помощью MALDI-масс спектрометрии, ¹H-ЯМР-спектроскопии, а также с помощью электронной спектроскопии поглощения. Строение цианиновых красителей подтверждено с помощью MALDI-масс спектрометрии и электронной спектроскопией поглощения.
5. Синтезированы активированные (N-гидроксисукцинимидные) производные полученных индодикарбоцианиновых красителей.
6. Конденсацией аминокислотных олигонуклеотидов с активированными производными модифицированных индодикарбоцианиновых красителей получены меченые олигонуклеотидные зонды и праймеры.
7. Показана перспективность использования новых флуоресцентномеченных олигонуклеотидов в системах ПЦР ДНК-диагностики и технологии биологических микрочипов.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Кузнецова В.Е., Лукьянова Т.А., Василюков В.А., Харитонов О.В., Чудинов А.В., Заседателев А.С. Водорастворимые цианиновые красители для технологии биологических микрочипов.// Известия Академии наук. Серия химическая. – 2007. - №12 – С. 1-5.
2. Лукьянова Т.А., Зайцева М.А., Карпов В.А., Позмогова Г.Е. Синтез и масс-спектрометрия олигонуклеотидов, несущих тиофосфорильные модификации заданной локализации.//Биоорганическая химия. – 2008. – Т. 34. – №1. – С.1-6.
3. Татаринова О.Н., Лукьянова Т.А., Зайцева М.А., Веремеев К.Ю., Карпов В.А., Чувилин А.Н., Петрунин Д.Д., Позмогова Г.Е. Влияние способов очистки олигодезоксирибонуклеотидных зондов на эффективность REAL-TIME PCR диагностики.//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины РАМН. – 2008. – Т.145. – №3. – С.280.
4. Лукьянова Т.А., Михейкин А.Л., Чудинов А.В. Синтез модифицированного флуоресцентного красителя ближнего ИК-диапазона для технологии биологических микрочипов.// XVI зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва. – 2004. – С.89.
5. Кузнецова В.Е., Лукьянова Т.А., Михейкин А.Л., Харитонов О.В., Чудинов А.В. Полиметиновые красители для технологии биологических микрочипов.// X Международная научно-техническая конференция «Научное химическое технологии – 2004». Волгоград. – 2004. – Т.1. – С.269-271.
6. Лукьянова Т. А., Зайцева М. А., Позмогова Г. Е. Получение олигонуклеотидов, несущих тиофосфорильные модификации заданной локализации.// Материалы докладов XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». — Москва. - 2007. - <http://www.lomonosov-msu.ru/2007/>.]
7. Лукьянова Т.А., Чувилин А.Н., Позмогова Г.Е. Особенности хроматографического поведения олигодезоксирибонуклеотидных REAL-TIME PCR зондов.// Материалы докладов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». — Москва. - 2008. — <http://www.lomonosov-msu.ru/2008/>.]
8. Зайцева М. А., Калужный Д. И., Лукьянова Т. А., Щелкина А. К., Борисова О. Ф., Позмогова Г. Е. Структурные исследования локально тиофосфорилированных олигонуклеотидов d(GGTGGTTGTGGTGGT), аналогов антитромбинового аптамера.// Материалы XVIII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Москва. - 2007. - Т. 4. - С. 535.

9. Татаринова О.Н., Лукьянова Т.А., Зайцева М.А., Карпов В.А., Чувиллин А.Н., Позмогова Г.Е. Специфика обращено-фазовой ВЭЖХ олигодезоксирибонуклеотидных зондов для Real-Time PCR генодиагностики. // Тезисы докладов III Международной конференции "Фундаментальные науки - медицине". Новосибирск. - 2007. - С.143.