

Новые конъюгаты фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов с остатками бис-имидазол-содержащих пептидоподобных соединений

Павлова А.*, Дюдеева Е., Королева Л., Григорьева Е., Дмитриенко Е., Коваль О.,
Пышный Д., Пышная И.

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

* pavlova@niboch.nsc.ru

Ключевые слова: антисмысловые олигонуклеотиды; фосфорилгуанидины; CuAAC; расщепление РНК

Мотивация и цель: Присоединение низкомолекулярных реакционно-способных соединений, расщепляющих фосфодиэфирные связи в РНК, к антисмысловым олигонуклеотидам является актуальным направлением в биомедицине для разработки новых средств на их основе и/или повышения эффективности их действия [1]. Отдельную задачу представляет синтез конъюгатов модифицированных олигонуклеотидов с РНК-расщепляющими группировками, поскольку это может расширить возможности их применения. Целью данной работы было получение конъюгатов олигодезоксирибонуклеотидов, в том числе содержащих фосфорилгуанидиновые (ФГ) модификации, с остатками бис-имидазол-содержащих пептидоподобных соединений и исследование их активности *in vitro*.

Методы и алгоритмы: Для синтеза конъюгатов использовали реакцию азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемую ионами одновалентной меди, протекающую с образованием 1,4-дизамещенных 1,2,3-триазолов (CuAAC). Реакцию проводили с участием олигонуклеотида, закреплённого на полимерном носителе CPG и содержащего на 5'-конце терминальную алкинильную группировку. Предварительное введение в олигонуклеотид алкинильной группы проводили в процессе стандартного твердофазного фосфитамидного синтеза с использованием ранее полученных соответствующих амидофосфитов [2]. После выделения синтезированных конъюгатов методом электрофореза проводили исследование их реакционной способности к гидролизу РНК-мишени в условиях, близких к физиологическим. Способность конъюгатов к подавлению экспрессии мРНК проводили с использованием клеточной культуры НЕК293-FT, экспрессирующей EGFP, методом цитофлуориметрии по изменению уровня флуоресценции белка. Для трансфекции олигонуклеотидов и их конъюгатов использовали Lipofectamine® 3000.

Результаты: Синтезирован ряд конъюгатов олигодезоксирибонуклеотидов, в том числе содержащих ФГ модификации, с остатками бис-имидазол-содержащих пептидоподобных соединений, отличающихся длиной линкеров в своей структуре. Исследование реакционной способности показало, что в случае использования конъюгатов с десятью ФГ модификациями короткие модельные РНК гидролизуются *in vitro* в среднем на 8–20 % лучше (от ~16 до ~50 % за 3 ч), чем в случае конъюгатов без модификаций (от ~8 до ~30 %). Наибольшая степень

расщепления мишени (~50 %) наблюдалась для ФГ-содержащего конъюгата с наиболее коротким линкером между остатками имидазола в присоединенной группировке. Исследование подавления экспрессии мРНК EGFP показало, что в сравнении с олигонуклеотидом без реакционно-способной группировки конъюгаты демонстрировали схожую эффективность по снижению уровня флуоресценции экспрессируемого клетками белка. Степень подавления уровня EGFP различалась в зависимости от используемой последовательности антисмыслового олигонуклеотида или конъюгата.

Выводы: Таким образом, с использованием ранее полученных амидофосфитов предложен твердофазный вариант применения реакции CuAAC для синтеза конъюгатов олигодезоксирибонуклеотидов, в том числе содержащих ФГ модификации, с остатками бис-имидазол-содержащих пептидоподобных соединений, и проведена валидация методики для ряда нуклеотидных последовательностей. С использованием коротких РНК-мишеней *in vitro* показано, что введение в олигонуклеотид ФГ модификаций позволяет повысить степень расщепления РНК данными конъюгатами. С использованием клеточной культуры показано, что присоединение бис-имидазол-содержащих пептидомиметиков не оказывает негативного влияния на эффективность подавления уровня экспрессии EGFP.

Финансирование: Исследование проводилось в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

Novel conjugates of phosphorylguanidine oligonucleotides with bisimidazol-containing peptidomimetics

Pavlova A.*, Dyudeeva E., Koroleva L., Grigoryeva E., Dmitrienko E., Koval O., Pyshnyi D., Pyshnaya I.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* *pavlova@niboch.nsc.ru*

Key words: antisense oligonucleotides; phosphorylguanidines; CuAAC; RNA cleavage

Motivation and Aim: The attachment of low-molecular-weight bioreactive compounds that cleave phosphodiester bonds in RNA to antisense oligonucleotides is a relevant area in biomedicine for the development of new agents based on them and/or increasing their efficacy [1]. Synthesis of conjugates of modified oligonucleotides with RNA-cleaving groups represents a special task, as it can expand the possibilities of their application. The aim of this work was to synthesise conjugates of oligodeoxyribonucleotides, including those containing phosphorylguanidine (PG) modifications, with residues of bisimidazole-containing peptidomimetics and to study their activity *in vitro*.

Methods and Algorithms: For the synthesis of conjugates, the azide-alkyne cycloaddition catalysed by monovalent copper ions was used to form 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles (CuAAC). The reaction was carried out with an oligonucleotide that had a terminal alkynyl group at the 5' end and was attached to a CPG solid support. The introduction of the alkynyl group into the oligonucleotide was carried out by standard phosphoramidite solid-phase synthesis using previously obtained corresponding phosphoramidites [2]. After isolation of the synthesized conjugates, their reactivity towards the hydrolysis of

the target RNA was studied by electrophoresis under conditions close to physiological. The ability of the conjugates to inhibit mRNA expression was tested in HEK293-FT cell cultures expressing EGFP using flow cytometry to determine the change in protein fluorescence levels. The oligonucleotides and their conjugates were transfected using the Lipofectamine® 3000.

Results: A series of conjugates of oligodeoxyribonucleotides, including those containing PG modifications, with residues of bisimidazole-containing peptidomimetics differing in the length of linkers in their structure were synthesized. Reactivity studies showed that conjugates with ten PG modifications hydrolyzed short model RNAs in vitro on average 8–20% better (from ~16 to ~50 % in 3 h) than conjugates without modifications (from ~8 to ~30 %). The highest degree of target cleavage (~50 %) was observed for the PG-containing conjugate with the shortest linker between imidazole residues in the attached moiety. EGFP mRNA silencing studies showed that the conjugates were similarly effective in reducing the level of fluorescence of the protein expressed by the cells compared to an oligonucleotide without a reactive group. The degree of EGFP silencing varied depending on the antisense oligonucleotide or conjugate sequence used.

Conclusion: Thus, using previously obtained phosphoramidites, a solid-phase version of the CuAAC reaction was proposed for the synthesis of conjugates of oligodeoxyribonucleotides, including those containing PG modifications, with residues of bisimidazole-containing peptidomimetics, and the method was validated for a number of nucleotide sequences. Using short RNA targets in vitro, it was shown that the introduction of PG modifications to the oligonucleotide can increase the degree of RNA cleavage by these conjugates. Using cell culture, it has been shown that the attachment of bisimidazole-containing peptidomimetics to the antisense oligonucleotides does not adversely affect the efficiency of silencing EGFP expression levels.

Funding: This work was financially supported by the Russian State-funded project for the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICBFM, SB RAS) (grant number 121031300042-1).

Список литературы/References

1. Staroseletz Y., Gaponova S., Patutina O., Bichenkova E., Amirloo B., Heyman T., Chiglintseva D., Zenkova M. Site-Selective Artificial Ribonucleases: Renaissance of Oligonucleotide Conjugates for Irreversible Cleavage of RNA Sequences. *Molecules*. 2021;26(6):1732. doi 10.3390/molecules26061732
2. Pavlova A.S., Ogurtsova P.A., Koroleva L.S., Serpokrylova I.Y., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Silnikov V.N., Pyshnyi D.V. Novel Bisimidazole-Containing Peptidomimetic Molecules for Metal-Independent RNA Cleavage: Synthesis and Solid-Phase Screening Method. *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2019;45(6):813-824. doi 10.1134/S1068162019060311