

РАЗРАБОТКА ТЕСТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ ХИРАЛЬНЫХ МОНОМЕРОВ ПОЛИАМИДНЫХ МИМЕТИКОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Д.И. Прохоров, научный сотрудник, М.А. Льянов, аспирант, О.В. Есипова, доцент, С.В. Еремин, старший преподаватель, Ю.Г. Кириллова, доцент
кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии

МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: pna-miht@yandex.ru

Описан подход для определения энантиомерной чистоты хиральных мономеров α -полиамидных миметиков нуклеиновых кислот на основе L-аланина и L-глутаминовой кислоты прямым методом. Тест заключался в синтезе рацемической смеси для каждого мономера исходя из DL-глутаминовой кислоты или DL-аланина, подборе системы для прямого разделения энантиомеров на хиральном сорбенте Диасфер-Chirasel-E методом ВЭЖХ и последующей оценке содержания основного энантиомера, полученного из L-аланина или L-глутаминовой кислоты.

An approach for the determination of enantiomeric purity of chiral monomers of α -polyamide mimetics of nucleic acids is described. The test consisted of three steps: synthesis of each monomer as a racemic mixture from DL-Glu or DL-Ala, then selection of an eluent system for direct enantiomers separation on chiral phase by HPLC, and subsequent estimation of the amount of the major enantiomer obtained from L-Ala or L-Glu.

Ключевые слова: пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК), полиамидные миметики нуклеиновых кислот, энантиомерная чистота, хиральный сорбент, ВЭЖХ.

Key words: peptide nucleic acids (PNA), polyamide mimetics of nucleic acids, enantiomeric purity, chiral sorbent, HPLC

Модификации нуклеиновых кислот (рис. 1А) направлены на увеличение специфичности связывания с ДНК или РНК, а, следовательно, на создание более быстрых и надежных методов диагностики и лечения генетических заболеваний. Значительную роль в этой области играют «классические» пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК, рис. 1Б) [1]. В настоящий момент одним из центральных направлений исследований является изучение следующего поколения ПНК – хиральных полиамидных миметиков нуклеиновых кислот (ПАНКМ).

селективность (чувствительность к некомплементарным основаниям) и эффективность их связывания с комплементарными олигонуклеотидами природного строения, а в некоторых случаях способствовало увеличению растворимости и биодоступности данных соединений. Таким образом, было показано, что конфигурация оптических центров исходных аминокислотных остатков в составе мономеров и олигомеров хиральных ПАНКМ напрямую определяет их свойства (направление закручивания спирали, стабильность образуемых комплексов с нуклеиновыми кислотами и др.) [2].

Отдельной задачей при создании хиральных ПАНКМ является разработка методов контроля оптической чистоты синтезируемых соединений, как на стадии мономерного синтеза, так и в ходе олигомеризации на твердой фазе. Таким образом, актуальной задачей является разработка новых универсальных методов оценки и контроля оптических характеристик хиральных ПАНКМ.

В настоящее время для анализа производных α -аминокислот успешно используют такие методы, как хроматография (прямой метод с использованием хиральных селекторов, разделение диастереомеров), ЯМР-спектроскопия с использованием «сдвигающих» агентов и оптически активных дериватирующих агентов [3, 4]. Однако открытым остается вопрос о разработке эффективных методов, позволяющих работать с более сложными структурами, содержащими в своем составе различные функциональные фрагменты (гетероциклические основания, полярные группы и др.).

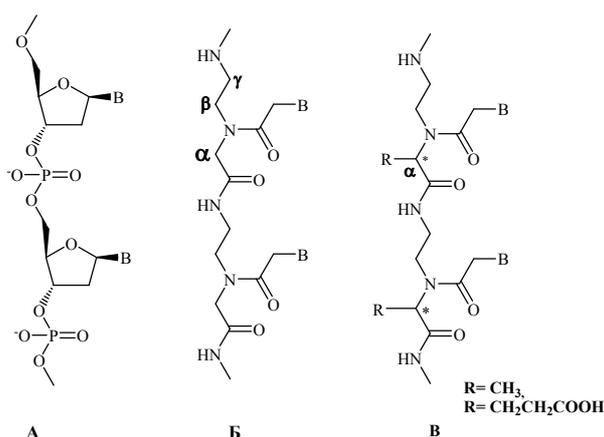


Рис. 1. Структура ДНК (А), «классических» (Б) и α -хиральных (В) ПАНКМ (В = Ade, Gua, Thy, Cyt).

Одним из способов хиральной дериватизации «классических» ПНК является введение различных заместителей в α - или γ -положения N-2-аминоэтилглицинового (аег) остова (рис. 1В). Наличие хиральности в структуре олигомеров аег-ПАНКМ значительно улучшило

Нами разработаны подходы к созданию метода определения оптической чистоты мономеров ПАНКМ с использованием ВЭЖХ на хиральном сорбенте. Для этих целей использовали хроматографическую колонку, загруженную новым гибридным сорбентом на основе силикагеля с иммобилизованным антибиотиком – эремомидином (Диафер-110-Chirasel-E-PA (7 мкм, 4×250 мм), ЗАО «БиоХимМак СТ»). Ранее было показано, что данный селектор обладает высокой энантиоселективностью по отношению к модифицированным α- и β-аминокислотам и их производным [5, 6].

На первом этапе исследования нами был осуществлен синтез α-замещенных мономеров ПАНКМ на основе рацемических аминокислот (*DL*-Glu и *DL*-Ala). Синтез данных рацематов осуществляли по разработанной нами общей стратегии, используемой для получения хиральных мономеров ПАНКМ [7, 8]. В результате было синтезировано 8 мономеров с использованием всех 4-х нуклеиновых оснований (рис. 2)

Полученные соединения были охарактеризованы с использованием ¹H-ЯМР-спектроскопии, их хроматографическая подвижность по данным ТСХ совпадала с подвижностью аналогичных *L*-мономеров.

Следующий этап исследования заключался в подборе хроматографической системы растворителей для оптимального разделения *D*- и *L*-

энантиомеров. Была проведена оценка энантиоселективности выбранного сорбента в отношении синтезированных нами соединений **1a-d**, **2a-d**. Для этой цели осуществляли подбор оптимального состава элюента (соотношение компонентов и характер модификатора), а также детальное изучение влияния pH и ионной силы элюента на селективность хроматографического разделения. Наиболее подходящим для разделения энантиомеров элюентом оказалась система: 0.02 М ацетат аммония в смеси метанол–вода, 9 : 1, pH 3.4.

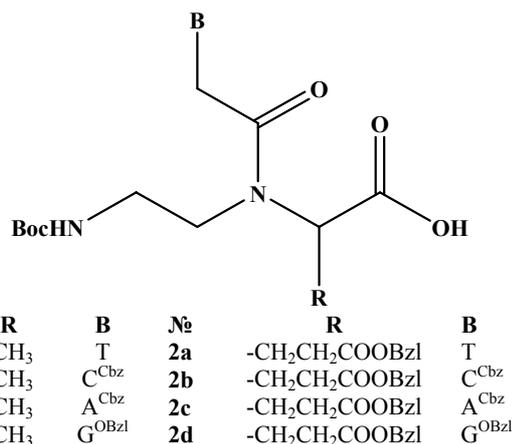


Рис. 2. Структура мономеров ПАНКМ, полученных на основе *DL*-аланина и *DL*-глутаминовой кислоты.

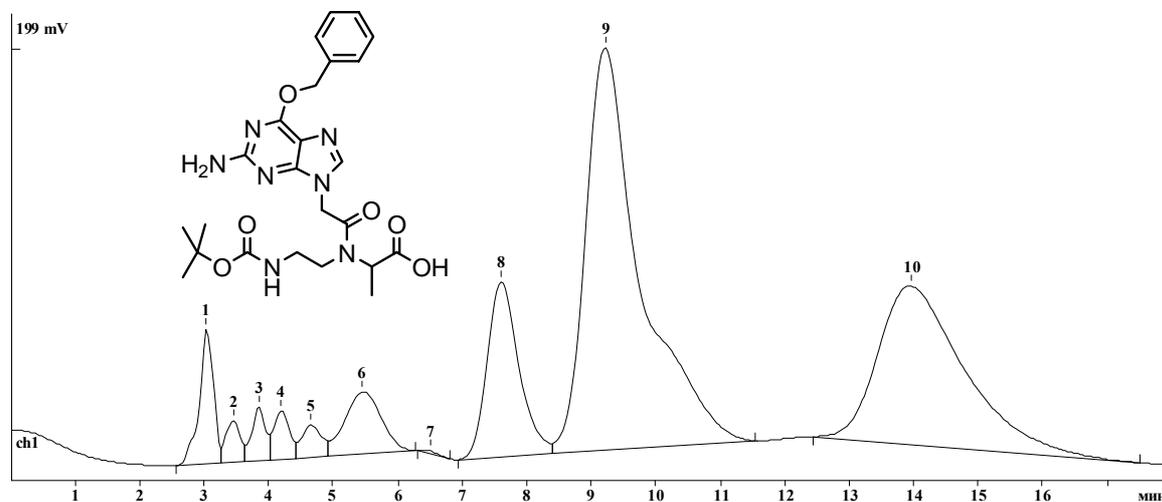


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограмма гуанинового мономера (**1d**) ПАНКМ на основе *DL*-аланина.

Для большинства синтезированных нами веществ в данных условиях наблюдалось энантиомерное разделение, но добиться полной селективности (расхождения хроматографических пиков) нам не удалось. Однако при разделении некоторых мономеров, в частности, гуанинового мономера **1d** ПАНКМ на основе *DL*-аланина (рис. 3), было зафиксировано разделение не только энантиомеров, но также и ротационных структур, возникающих в результате затрудненного вращения вокруг амидной связи в структуре мономера ПАНКМ (рис. 4).

Подводя итоги, следует отметить, что для эффективного и однозначного разделения мономеров ПАНКМ использование выбранного нами хроматографического носителя не является оптимальным решением. Сложность структуры синтезированных нами соединений требует дальнейшего поиска новых методов хирального разделения. Одним из возможных вариантов может быть использование других хиральных селекторов для ВЭЖХ, например, на основе хитозана. Также для решения обозначенной проблемы следует использовать

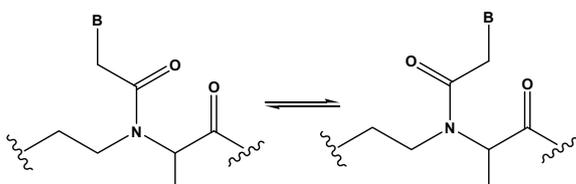


Рис. 4. Образование ротамерных структур в молекуле ПАНКМ.

методы, основанные на предварительной дериватизации анализируемых мономеров ПАНКМ оптически активными соединениями с

последующим разделением полученных диастереомеров хроматографическими методами, или с использованием ЯМР-спектроскопии для оценки энантиомерного состава.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (госконтракт № 14.740.11.0634) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант 09-04-01026а).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide / P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt // *Science*. – 1991. – Vol. 254. – P. 1497–1500.
2. Peptide nucleic acids with a structurally biased backbone: effects of conformational constraints and stereochemistry / R. Corradini [et al.] // *Curr. Topics in Med. Chem.* – 2007. – Vol. 7. – P. 681–694.
3. Direct enantiomeric separation of N-aminoethylamino acids: determination of enantiomeric excess of chiral peptide nucleic acids (PNAs) by GC / R. Corradini, G. D. Silvestro, S. Sforza, G. Palla, A. Dossena, P.E. Nielsen, R. Marchelli // *Tetrahedron: Asymmetry*. – 1999. – Vol. 10. – P. 2063–2066.
4. Synthesis of conformationally preorganized and cell-permeable guanidine-based γ -Peptide Nucleic Acids (γ GPNA) / B. Sahu, V. Chenna, K. L. Lathrop, S. M. Thomas, G. Zon, K. J. Livak, D. H. Ly // *J. Org. Chem.* – 2009. – Vol. 74. – P. 1509–1516.
5. Сорбенты с иммобилизованными гликопептидными антибиотиками для разделения оптических изомеров методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / М. А. Кузнецов, П. Н. Нестеренко, Г. Г. Васяров, С. М. Староверов // *Прикл. биохимия и микробиология*. – 2006. – Т. 42, № 6. – С. 615–623.
6. Высокоэффективная жидкостная хроматография энантиомеров α -аминокислот на силикагеле с иммобилизованным эремомицином / М. А. Кузнецов, П. Н. Нестеренко, Г. Г. Васяров, С. М. Староверов // *Журн. аналит. химии*. – 2008. – Т. 63, № 1. – С. 64–72.
7. Синтез тиминсодержащего мономера отрицательно заряженных ПНК / Д. И. Прохоров, Ю. Г. Кириллова, Н. П. Боярская, А. Н. Тевяшова, О. В. Есипова, Е. Н. Звонкова, В. И. Швеиц // *Хим.-фарм. журн.* – 2005. – Т. 39, № 6. – С. 39–43.
8. Исследование путей синтеза цитозинового мономера отрицательно заряженных пептидно-нуклеиновых кислот / А. В. Баранов, Н. С. Цвид, В. И. Лукьянченко, Д. И. Прохоров, Ю. Г. Кириллова, В. И. Швеиц // *Вестник МИТХТ*. – 2007. – Т. 2, №5. – С. 28–32.