

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ ОЛИГОМЕРОВ ПОЛИАМИДНЫХ МИМЕТИКОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

М.В. Ширяева, аспирант, Ю.Г. Кириллова, доцент, О.В. Есипова, доцент,
С.В. Еремин, старший преподаватель, *Т.А. Лукьянова, научный
сотрудник, В.И. Швец, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

* ООО «НПФ Лутех»

e-mail: pna-miht@yandex.ru

Разработан Вос-протокол ручного твердофазного синтеза новых последовательностей отрицательно заряженных олигомеров полиамидных миметиков нуклеиновых кислот с регулярной структурой псевдопептидного остова на основе L-глутаминовой кислоты и глицина и различным положением карбоксиэтильного остатка. Представлены условия для их удаления с полимерного носителя, выделения и доказательства структуры.

A Вос-protocol for manual solid-phase synthesis of novel sequences of negatively charged oligomeric polyamide mimetics of nucleic acids with a regular structure of the pseudopeptide backbone based on L-glutamic acid and glycine and having various positions of the carbethoxyethyl moiety was developed. Conditions for their cleavage from polymeric carrier, isolation and structure confirmation are presented.

Ключевые слова: пептидно-нуклеиновые кислоты, полиамидные миметики нуклеиновых кислот, твердофазный синтез, Вос-протокол.

Key words: peptide nucleic acids, polyamide mimetics of nucleic acids, solid-phase synthesis, Вос-protocol.

В настоящее время ведется интенсивный поиск различных ДНК-миметиков, одной из разновидностей которых являются пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК), имеющие в своем составе псевдопептидные фрагменты. Следует отметить, что ПНК обладают рядом преимуществ по сравнению с другими ДНК-миметиками. Во-первых, благодаря остову неприродного строения они устойчивы к действию клеточных ферментов; во-вторых, длина олигомера, необходимая для связывания с мишенью, может быть короче десяти мономерных единиц (в то время как необходимая для специфичного связывания длина в случае природных олигонуклеотидов составляет от 11 до 15 нуклеотидов) [1]. Также в литературе описаны примеры использования ПНК как противоопухолевых, противовирусных агентов и антибактериальных препаратов.

К настоящему моменту на основе «классических» ПНК (аминоэтилглициновых) (рис. 1А) [2] и принципах гибридизации с нуклеиновыми кислотами (НК) создан ряд технологий и методов, успешно применяемых в молекулярной биологии (расщепление и очистка нуклеиновых кислот, анализ и определение генетических мутаций, альтернатива саузерн-блоттингу, контроль над ПЦР-амплификацией) [3].

Мономерное звено «классических» ПНК – удобный синтон для дальнейшей дериватизации как по гетероциклическому, так и псевдопептидному фрагментам. При сохранении основных структурных черт остова все модифицированные ПНК имеют свой индивидуальный набор свойств: гибридизационные характерис-

тики, растворимость, способность к проникновению через клеточную и ядерную мембраны. Введение различных остатков в α - или γ -положения псевдопептида или встраивание циклических фрагментов привело к возникновению следующего поколения ПНК – хиральных ациклических и циклических полиамидных миметиков нуклеиновых кислот (ПАНКМ). Изучение свойств этих соединений, таких как аффинность (эффективность связывания с некомплементарными нуклеиновыми кислотами) и селективность (чувствительность к некомплементарным гетероциклическим основаниям) по отношению к олигонуклеотидам природного строения, направлены на выявление фундаментальных принципов взаимосвязи структуры полиамидного НК-миметика и точности комплементарного молекулярного узнавания, а также на расширение прикладного применения ПАНКМ и их аналогов *in vitro* и *in vivo*. Интересной и перспективной является регулярная полианионная хиральная модификация. В данном случае ПАНКМ заряжены одноименно с НК, а расположение хиральных центров в α - или γ -положениях остова определяют параметры и направление закручивания образующейся спирали (вправо или влево). Такая модификация будет сочетать, по всей видимости, высокую аффинность, устойчивость ПАНКМ и некоторые свойства природных нуклеиновых кислот.

В области создания новых видов ПАНКМ наше внимание направлено на отрицательно заряженные ПАНКМ на основе L-глутаминовой кислоты (рис. 1Б). Введение отрицательного заряда в структуру «классических» ПНК, по

всей видимости, будет повышать их растворимость в воде, снижать самоагрегацию, позволит управлять процессом гибридизации путем

изменения ионной силы раствора, а также увеличит специфичность их связывания с протяженными последовательностями НК.

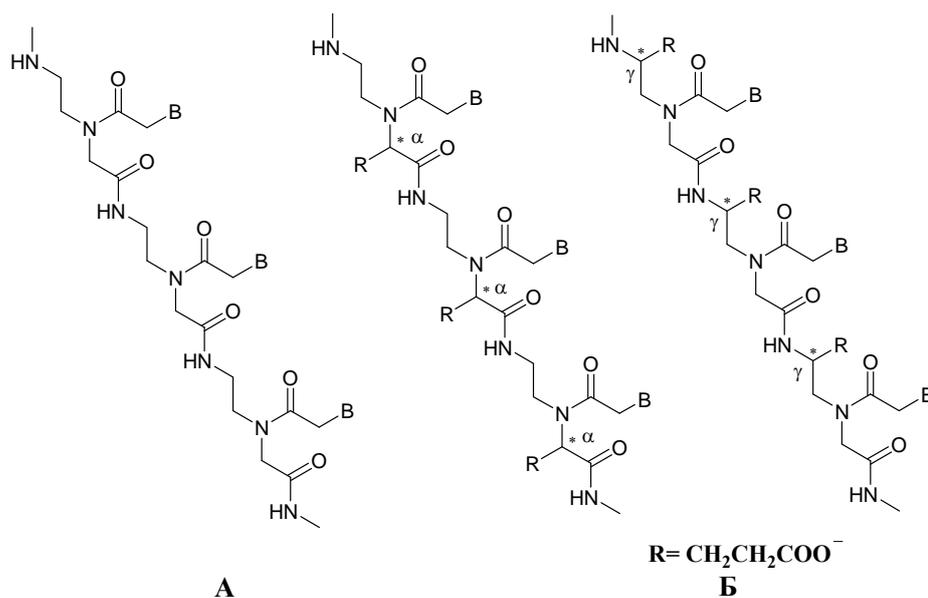


Рис. 1. Структура «классических» ПНК (А) и отрицательно заряженных α - и γ -ПАНКМ на основе *L*-глутаминовой кислоты (Б).

Ранее в нашей лаборатории были получены тиминсодержащие декамеры отрицательно заряженных (ОЗ) α -ПАНКМ на основе *L*-глутаминовой кислоты [4] по модифицированному Вос-протоколу синтеза «классических» ПНК [5, 6] на МВНА-смоле (полистирол с (4-метилбензгидрил)аминогруппами, сшитый 1-2% дивинилбензола). Однако для синтеза олигомеров ОЗ ПАНКМ, содержащих другие гетероциклические основания (рис. 2), необходима иная система для их полного деблокирования и удаления с полимерного носителя. Поэтому основной задачей данного этапа исследований был поиск такой системы и отработка методики твердофазного синтеза ОЗ ПАНКМ.

Загрузку полимерного носителя осуществляли конденсацией первого мономера с аминогруппами полимерного носителя и последующим кэпированием непрореагировавших аминогрупп системой уксусный ангидрид–диметилформамид–дихлорметан ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMF}/\text{DCM}$, 1:1:1, v/v/v) в присутствии 2 экв. диизопропилэтиламина (DIEA).

Вос-защитную группу удаляли трифторуксусной кислотой (TFA) с добавлением 5% *m*-крезола. Нейтрализация концевой аминогруппы растущей цепи олигомера в сочетании с активацией *in situ* свободной α -карбоксовой группы мономера позволяет избежать реакции *N*-ацильного переноса, которая является причиной образования структурных изомеров продуктов олигомеризации [5]. Мономер ПАНКМ

активировали системой $\text{HBTU}/\text{DMF}/\text{DIEA}$ (HBTU – гексафторфосфат *O*-(бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурия) и добавляли к полимерному носителю. Реакцию конденсации проводили при перемешивании потоком аргона в течение 2 ч. Полноту протекания реакции контролировали по качественному нингидриновому тесту Кайзера [7]. Использование трехкратных избытков мономеров по отношению к реакционноспособным аминогруппам, увеличение времени конденсации с 10–15 мин [2, 3] до 2 ч позволило отказаться от дополнительных этапов кэпирования после каждой стадии конденсации. Для деблокирования и удаления с носителя полученных олигомеров ПАНКМ необходимой длины использовали систему «*low-high*» TFMSA (трифторметансульфокислота) [4]. Обработка раствором «*low*» (TFMSA/TFA/*m*-крезол/DMS, 1:11:2:6, v/v/v/v) (DMS – диметилсульфид) приводит к удалению всех защитных групп, а раствором «*high*» (TFMSA/TFA/*m*-крезол, 1:8:1, v/v/v) – к отщеплению олигомера ПАНКМ от полимерного носителя. Однако, синтезированные нами последовательности, включающие более трех мономерных звеньев, деградировали в данной системе из-за слишком жестких условий. В дальнейшем была найдена альтернативная система для отщепления ОЗ ПАНКМ со смолы – TFMSA/TFA/TES (3:1:0.1, v/v/v) (TES – триэтилсилан).

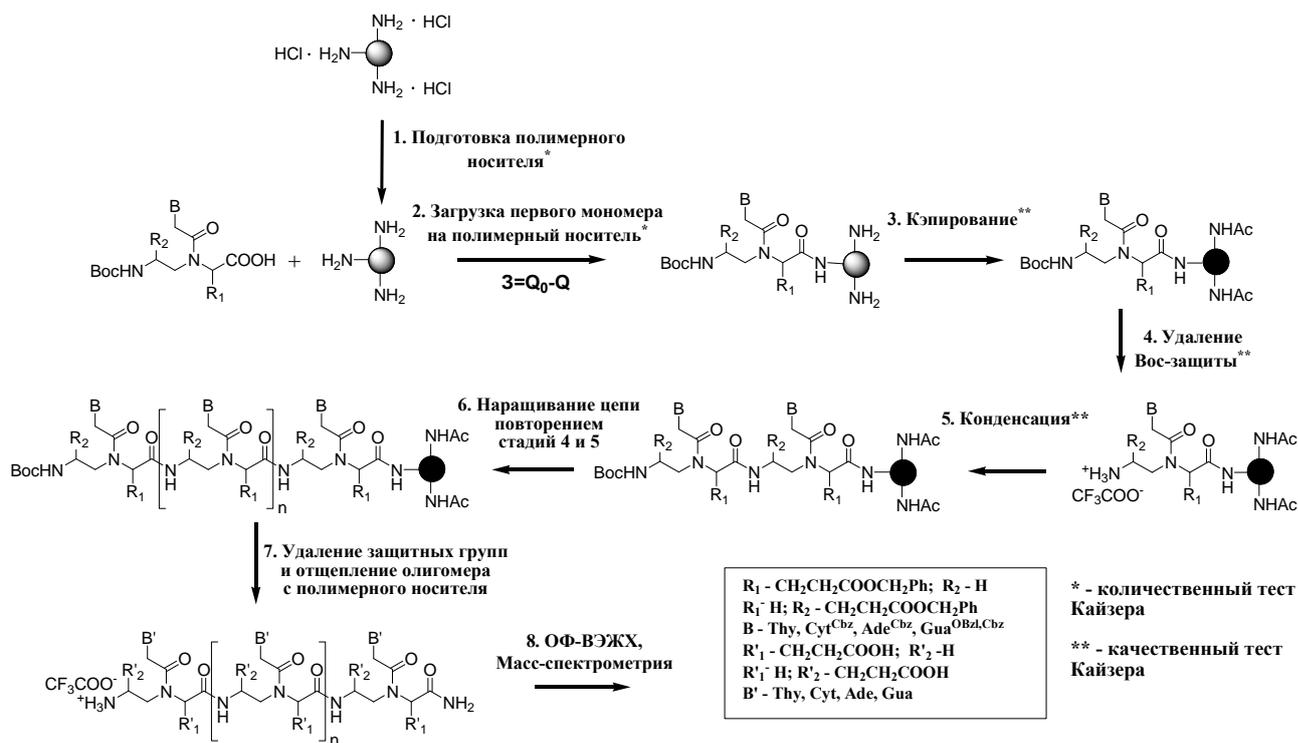


Рис. 2. Общая схема Вос-протокола твердофазного синтеза отрицательно заряженных α - и γ -ПАНКМ на основе *L*-глутаминовой кислоты.

По предложенной стратегии были синтезированы три различные последовательности α - и γ -ОЗ ПАНКМ:

1) Тример $\text{NH}_2(\text{TAC})\text{CONH}_2$ (Gly Ψ -*L*-Glu) (1) – данный олигомер получили при удалении с полимерного носителя системой «low-high» TFMSA (по 30 мин, 0°C).

2) Гексамер $\text{NH}_2(\text{TAGTAC})\text{CONH}_2$ (Gly Ψ -*L*-Glu) (2) – данный олигомер в условиях удаления с носителя системой «low-high» TFMSA выделить не удалось. При использовании данной системы последовательность расщепляется на фрагменты, отличающиеся по массе на одно мономерное звено, а также олигомеры различной длины, не содержащие гетероциклических оснований и карбоксиметильного линкера. Возможной причиной этого является наличие в олигомерах отрицательного заряда. Целевой олигомер был получен при удалении с носителя системой TFMSA/TFA/TES (30 мин, 0°C).

3) Тример $\text{NH}_2(\text{TCT})\text{CONH}_2$ (*L*-Glu Ψ Gly) (3) – данный олигомер также получили при удалении с полимерного носителя системой TFMSA/TFA/TES (30 мин, 0°C).

Полученные олигомеры выделяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Структуры синтезированных соединений подтверждали с помощью MALDI-TOF (матричной десорбционно-ионизационной времяпролетной) масс-спектрометрии (рис. 3).

Данные олигомеры ОЗ ПАНКМ были получены в количествах, необходимых для доказательства их структуры.

Таким образом, разработан Вос-протокол ручного твердофазного синтеза отрицательно заряженных ПАНКМ, подобраны условия для всех стадий синтеза ОЗ α -ПАНКМ на основе *L*-глутаминовой кислоты и глицина, содержащих четыре гетероциклических основания ДНК; найдена система для удаления олигомеров с полимерного носителя. Однако, для синтеза ОЗ γ -ПАНКМ требуется подбор условий (время реакции, соотношение компонентов и пр.), т.к. возможны побочные реакции циклизации.

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реагенты и растворители: НВТУ, уксусный ангидрид (Acros, Бельгия), TFA, TES, DIEA, Py (пиридин) (Lancaster, Великобритания), TFMSA (Acros Organics, США), DMS (Aldrich, США), *m*-крезол (Sigma-Aldrich, Германия), реактивы марки «х. ч.» и «ч. д. а.» отечественного производства: диметилформамид, дихлорметан, фенол, KCN, нингидрин, KOH, LiAlH₄, триэтиламмоний хлорид, фталиевый ангидрид, P₂O₅, CaCl₂, NaHCO₃, диэтиловый эфир, H₂SO₄.

Мономеры ОЗ ПАНКМ были наработаны в препаративных количествах по ранее описанным методикам – α -мономеры [6, 8, 9] и γ -мономеры [10, 11].

Твердофазный синтез осуществляли на МВНА-смоле (100 мг, 0.591 ммоль NH₂/г смолы) (Acros, Бельгия) с загрузкой полимерного носителя 0.310 ммоль NH₂/г смолы. Все стадии синтеза проводили при перемешивании потоком аргона.

Аналитическую ВЭЖХ проводили на обращенной фазе, колонка Ultrasphere ODS C18

(4.6×150 мм; 5 мкм), в системе 0.1 М ацетат аммония с градиентом метанола от 0 до 30% за 30 мин; скорость потока 1 мл/мин, детекция при 254 нм (Knauer/ UV VIS Detector LCD 2563, Германия). MALDI-TOF-масс-спектры полученных олигомеров ПАНКМ регистрировали на приборах Bruker UltraFlex и Bruker MicroFlex (Германия); в качестве матрицы использовали раствор 2,5-дигидроксibenзойной кислоты или 3-гидроксипириколинной кислоты в системе вода–ацетонитрил, 1:1.

Общий протокол твердофазного синтеза

(1) Удаление Вос-защиты^{**}: TFA–*m*-крезол (95:5, v/v), 3 мл, 1×20 мин и 1×10 мин;

(2) Промывка DMF/DCM (1:1, v/v), 4 мл, 2×2 мин; промывка DMF, 4 мл, 2×2 мин;

(3) Конденсация^{**}: 0.085 М раствор HBTU (1 экв./1 экв. мономера) в DMF добавляли к раствору мономера (3 экв./1 экв. свободных NH₂-групп смолы) и DIEA (2 экв./1 экв. мономера) в DMF до конечной концентрации мономера 0.05 М. Выдерживали 5 мин при комнатной температуре. Время конденсации 2 ч;

(4) Промывка DMF, 4 мл, 2×2 мин; промывка DMF/DCM (1:1, v/v), 4 мл, 2×2 мин;

(5) Качественный ninгидриновый тест Кайзера [7], если тест был положительным – проводили повторную конденсацию.

Этапы (1)–(5) повторяли до получения олигомера необходимой длины.

^{**} Качественный ninгидриновый тест Кайзера. В случае синтеза последовательностей

длиннее тримера, после удаления Вос-защиты проводится количественный ninгидриновый тест Кайзера каждый третий цикл для отслеживания загрузки (должна совпадать с первоначально рассчитанным значением).

NH₂(TAC)CONH₂ (GlyΨ-*L*-Glu) (1) получали деблокированием и удалением с 10.0 мг полимерного носителя системой TFMSA/TFA/DMS/*m*-крезол (30 мин, 0°C). ВЭЖХ, время удерживания: 2.17 мин. Масс-спектр (MALDI-TOF), *m/z*: 1026.0 [*M* + H]⁺.

NH₂(TAGTAC)CONH₂ (GlyΨ-*L*-Glu) (2) получали деблокированием и удалением с 10.0 мг полимерного носителя системой TFMSA/TFA/TESi (30 мин, 0°C). ВЭЖХ, время удерживания: 18.04 мин. Масс-спектр (MALDI-TOF), *m/z*: 2075 [*M* + H]⁺.

NH₂(TCT)CONH₂ (*L*-GluΨGly) (3) получали деблокированием и удалением с 6.7 мг полимерного носителя системой TFMSA/TFA/TESi (30 мин, 0°C). ВЭЖХ, время удерживания: 10.15 мин. Масс-спектр (MALDI-TOF), *m/z*: 1017.0 [*M* + H]⁺.

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).

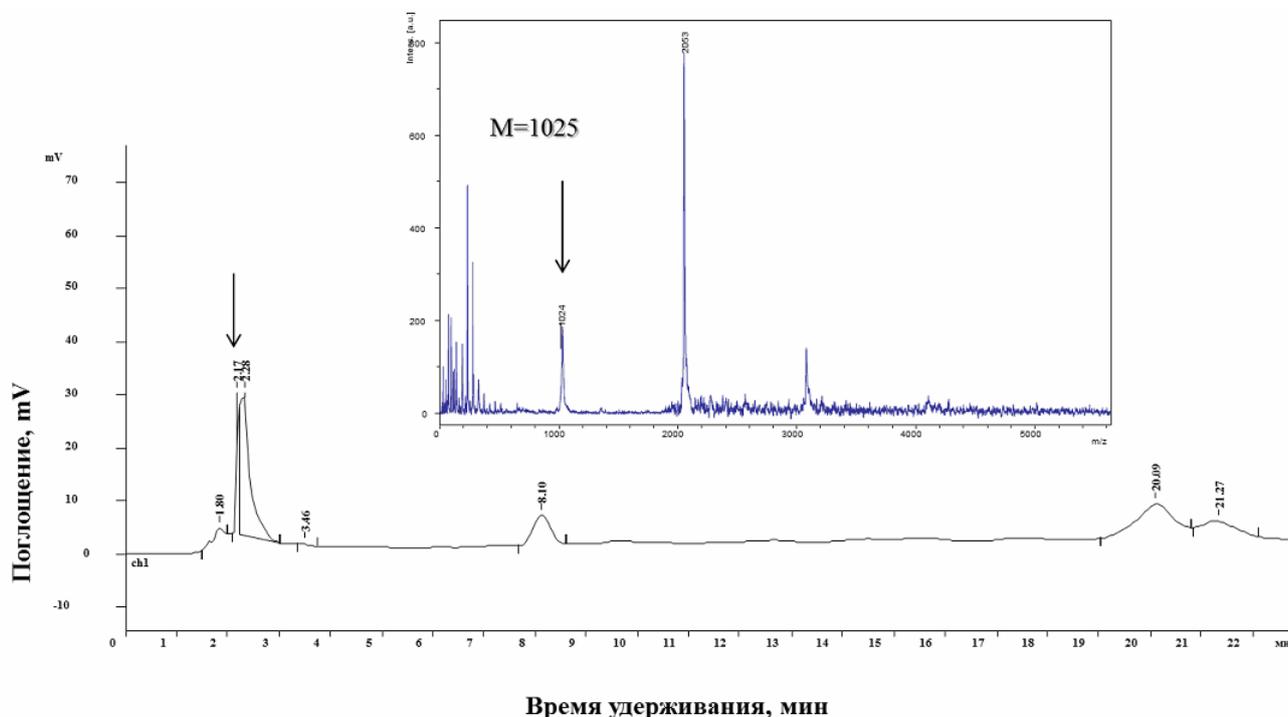


Рис. 3. Хроматограмма аналитической ОФ-ВЭЖХ реакционной массы после удаления со смолы тримера NH₂(TAC)CONH₂ (GlyΨ-*L*-Glu) (1) (условия см. Эксперимент. часть) и его MALDI-TOF-масс-спектр.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Jakimov D., Cetojevic-Simin D., Kojic V., Mrdanovic J. Peptide nucleic acid (PNA) more than anyone could imagine at the first sight // *Archive Oncology*. 2000. V. 8. № 1. P. 11–14.
2. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R. H., Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide // *Science*. 1991. V. 254. P. 1497–1500.
3. Pellestor F., Paulasova P. The peptide nucleic acid, efficient tools for molecular diagnosis // *Int. J. Mol. Med*. 2004. № 13. P. 521–525.
4. Боярская Н.П., Кириллова Ю.Г., Есипов Д.С., Швец В.И. Твердофазный синтез декамера отрицательно заряженных ПНК с псевдопептидной связью *Glyψ-L-Glu* // *Вестник МИТХТ*. 2007. Т. 2. № 5. С. 33–36.
5. Christensen L., Fitzpatrick R., Gildea B., Petersen K.H., Hansen H.F., Egholm M., Buchardt O., Nielsen P.E., Coull J., Berg R.H. Solid-phase synthesis of peptide-nucleic acids // *J. Peptide Science*. 1995. V. 3. P. 175–183.
6. Прохоров Д.И., Кириллова Ю. Г., Боярская Н.П., Тевяшова А.Н., Есипова О.В., Звонкова Е.Н., Швец В.И. Синтез тиминсодержащего мономера отрицательно заряженных ПНК // *Хим.-фарм. журн.* 2005. Т. 39. № 6. С. 39–43.
7. Гершкович А.А., Кибирев В.К. *Химический синтез пептидов*. – Киев: Наукова думка, 1992. С. 360.
8. Boyarskaya N.P., Prokhorov D.I., Kirillova Yu. G., Zvonkova E.N., Shvets V.I. Synthesis of protected pseudopeptides from dicarboxylic amino acids by Mitsunobu condensation // *Tetrahedron Lett*. 2005. V. 46. № 43. P. 7359–7362.
9. Баранов А.В., Цвид Н.С., Лукьянченко В.И, Прохоров Д.И., Кириллова Ю.Г., Швец В.И. Исследование путей синтеза цитозинового мономера отрицательно заряженных пептидно-нуклеиновых кислот // *Вестник МИТХТ*. 2007. Т. 2. № 5. P. 28–32.
10. Боярская Н.П., Прохоров Д.И., Стотланд Е.А., Кириллова Ю. Г., Звонкова Е. Н., Швец В.И. Синтез двух новых тиминсодержащих мономеров отрицательно заряженных ПНК // *Доклады Академии наук*. 2006. Т. 48. № 1. P. 55–58.
11. Кириллова Ю.Г, Баранов А.В., Прохоров Д.И., Есипова О.В., Швец В.И. Препаративное получение β-аминоспиртов из производных дикарбоновых аминокислот // *Журн. орган. химии*. 2009. Т. 45. № 9. P. 1330–1332.