

ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ ДЕКАМЕРА ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ ПНК С ПСЕВДОПЕПТИДНОЙ СВЯЗЬЮ *GlyψL-Glu*

Н.П. Боярская, Ю.Г. Кириллова, *Д.С. Есинов, В.И. Швеи

* МГУ им. М.В. Ломоносова

Представлен Вос-протокол и стратегия твердофазного синтеза отрицательно заряженных ПНК. Синтезирован новый тиминсодержащий декамер отрицательно заряженных ПНК на основе *L*-глутаминовой кислоты и глицина.

Синтетические молекулы, которые способны специфично связываться с выбранной мишенью в исследуемой последовательности гена, представляют большой интерес в медицине и биотехнологии. Модификации нуклеиновых кислот направлены на увеличение специфичности связывания с ДНК или РНК, а, следовательно, на создание более быстрых и надежных методов молекулярной биологии, диагностики, лечения генетических заболеваний. Значительную роль в этой области играют «классические» пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК) (рис. 1 Б) [1].

Нами предложена новая структура полиамидных ДНК-миметиков – отрицательно заряженные пептидно-

нуклеиновые кислоты (рис. 1 В). Введение отрицательного заряда в каждое мономерное звено псевдопептидного остова «классических» ПНК не только решит вопросы, связанные с растворимостью и самоагрегацией, но также позволит управлять процессом гибридизации, изменяя ионную силу раствора, и увеличит специфичность их связывания с сайтами-мишенями на длинных анализируемых последовательностях.

Синтез тиминсодержащего декамера отрицательно заряженных ПНК на основе *L*-глутаминовой кислоты с псевдопептидной связью *GlyψL-Glu* проводили по модифицированному Вос-протоколу синтеза «классических» ПНК [2, 3] на МВНА-смоле (схема 1).

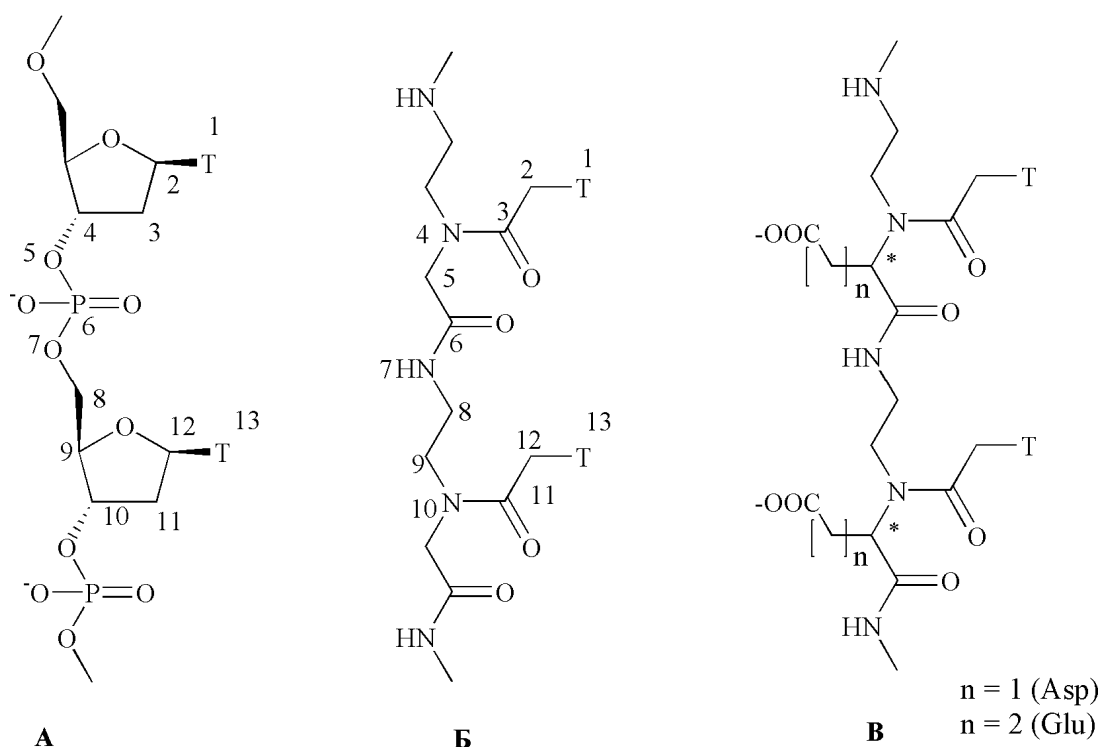


Рис. 1. Структура ДНК (А), «классических» (Б) и отрицательно заряженных ПНК (В).

Мономер (1) был наработан в препаративных количествах по ранее описанному методу [4, 5]. Загрузку полимерного носителя осуществляли в интервале 0.1–0.2 ммоль/г конденсацией соответствующего мономера с аминогруппами полимерного носителя и

последующим кэпированием непрореагировавших аминогрупп системой уксусный ангидрид/DMF/DIEA. Отсутствие линкера между смолой и первым мономером обусловлено регулярной, упорядоченной структурой отрицательно заряженных ПНК.

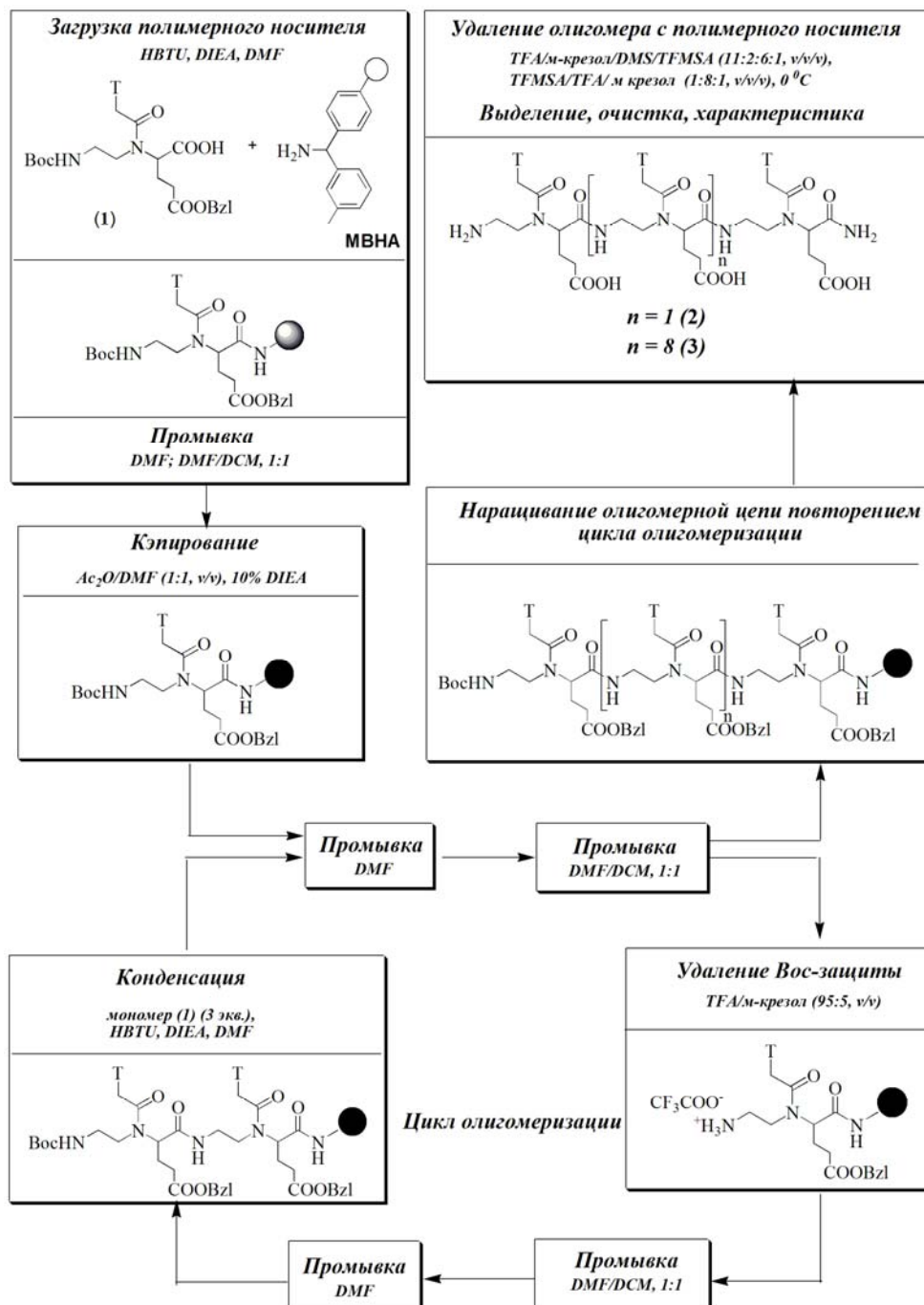


Схема 1.

Вос-защитную группу удаляли TFA с добавлением 5% м-крезола для предотвращения трифторацетилирования как растущего олигомера, так и полимерного носителя, что может привести к терминации цепи.

Конденсацию мономера с растущей олигомерной цепью, как и в случае загрузки полимерного носителя, проводили по методу активации *in situ* [2], что позволяет избежать реакции N-ацильного переноса гетероциклического

основания на концевую аминогруппу, которая представляет основную проблему твердофазного синтеза ПНК. Полноту протекания реакции контролировали по качественному тесту Кайзера [6]. 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 эквипирования после каждой стадии конденсации и упростить протокол синтеза. Олигомер ПНК необходимой длины деблокировали и удаляли с полимерного носителя стандартным методом «low-high» TFMSA (1 ч, 0⁰C) [7]. Контроль протекания твердофазного синтеза осуществляли после третьего шага синтеза.

По данным ВЭЖХ-анализа

реакционной массы тримерной последовательности (2) и MALDI-масс-спектра выделенного соединения (рис. 2 А), высокое процентное содержание основного вещества доказывало эффективность разработанного протокола и стратегии твердофазного синтеза. MALDI-масс-спектр основного вещества, выделенного с помощью аналитической ВЭЖХ из реакционной массы синтеза декамера Н-[Thy-(GlyψL-Glu)]₁₀-NH₂ (3), показал помимо пика с *m/z*, равным 3400, соответствующего целевому соединению, наличие укороченных последовательностей, отличающихся по массе на одно мономерное звено, а также олигомеров различной длины без остатка тимина и карбоксиметильного линкера, которые не разделяются хроматографически.

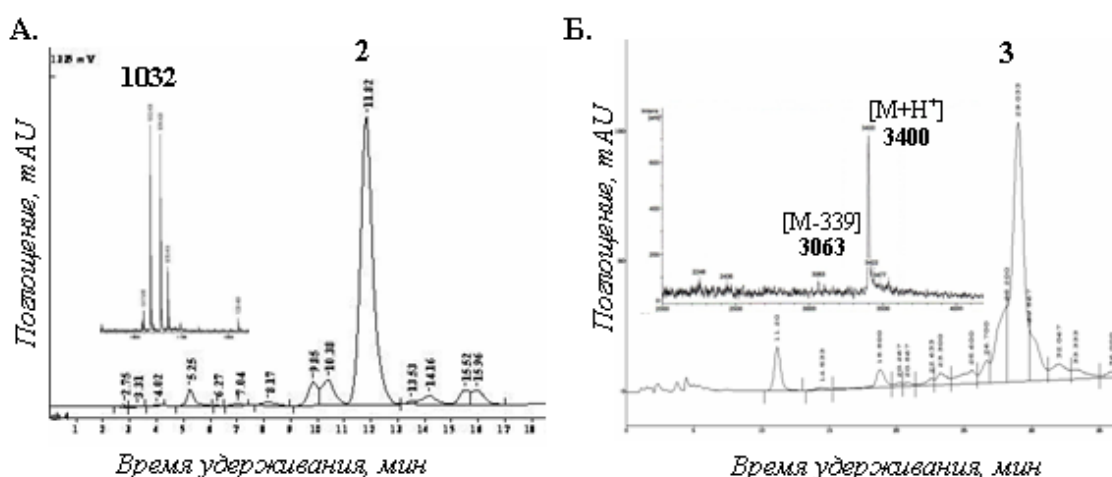


Рис. 2. Хроматограммы аналитической ВЭЖХ реакционных масс последовательностей Н-[Thy-(GlyψL-Glu)]₃-NH₂ (2) (А) и Н-[Thy-(GlyψL-Glu)]₁₀-NH₂ (3) (Б) на обращенной фазе С18 в системе 0.1 М ацетат аммония с градиентом метанола от 3 до 38% за 30 мин. и их MALDI-TOF-масс-спектры.

Ввиду того, что близкое расположение карбоксильной группы остатка глутаминовой кислоты к амидной связи может способствовать деградации цепи, было принято решение сократить время деблокирования и удаления декамера (3) с полимерного носителя с 1 ч до 15 и 20 мин каждой стадии, что позволило получить целевой декамер с чистотой 98% (рис. 2 Б) и выходом в среднем 60% на каждую стадию конденсации.

Таким образом, разработан протокол твердофазного синтеза отрицательно заряженных ПНК, подобраны условия каждой стадии цикла олигомеризации,

удаления олигомера со смолы и выделения с учетом особенностей данного класса соединений. Предложенный протокол может быть использован для синтеза отрицательно заряженных ПНК различного строения на основе соответствующих аминокислот и глицина, связанных псевдопептидной связью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез осуществляли на МВНА-смоле (150 мг) (0.6 ммоль/г) (Acros, Бельгия) с загрузкой полимерного носителя 0.14 ммоль/г. Все стадии синтеза проводили в псевдооживленном слое, перемешивая током инертного газа. Аналитическую

ВЭЖХ проводили на обращенной фазе в системах: (А) колонка Ultrasphere ODS C18 (4.6×250 мм; 5 мкм); 0.1 М ацетат аммония с градиентом метанола от 2.5 до 27.5% за 25 мин; скорость потока 1 мл/мин; (Б) колонка Separon C18 (3.3×150 мм; 5 мкм); 0.1 М ацетат аммония с градиентом метанола от 3.0 до 28.0% за 30 мин; скорость потока 0.5 мл/мин. MALDI-TOF-масс-спектры полученных олигомеров ПНК регистрировали на приборах Bruker UltraFlex и Bruker MicroFlex (Германия). В качестве матрицы использовали: раствор 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (А) или 3-гидроксипиколиновой кислоты (Б) в системе вода – ацетонитрил, 1 : 1.

Общий протокол твердофазного синтеза

Протокол синтеза: (1) Удаление Восзащиты: TFA–*m*-крезол (95:5, v/v), 2 мл, 1×10 мин и 1×20 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) 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) Несколько частиц смолы были высушены в вакууме масляного насоса для проведения качественного теста Кайзера [6]: если тест был положительным – проводили повторную конденсацию; если тест был отрицательным – переходили к следующей стадии. Этапы (1)–(5) повторяли до получения олигомера необходимой длины.

H-[Thy-(GlyψL-Glu)]₃-NH₂ (2)
получали деблокированием и удалением с 54.4 мг полимерного носителя по методу «*low-high*» TFMSA [6]. Продукт выделяли с помощью аналитической ВЭЖХ в системе А. Масс-спектр (MALDI-TOF): найдено для C₄₂H₅₇N₁₃O₁₈ 1032.4; вычислено: 1032.0.

H-[Thy-(GlyψL-Glu)]₁₀-NH₂ (3)
получали удалением с 9.0 мг смолы по стандартному методу «*low-high*» TFMSA с использованием более мягких условий: смолу обрабатывали раствором «*low*» TFMSA (TFA–*m*-крезол–DMS–TFMSA, 11:6:2:1) в течение 15 мин при 0°C и раствором «*high*» TFMSA (TFMSA–TFA–*m*-крезол, 1:8:1) в течение 20 мин при 0°C. Продукт выделяли с помощью аналитической ВЭЖХ в системе Б. Выход 7.8 мкг (60% на каждую стадию конденсации). Масс-спектр (MALDI-TOF): найдено для C₁₄₀H₁₈₃N₄₁O₆₀ 3400.0; вычислено: 3400.3.

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. Solid-phase synthesis of peptide-nucleic acids / L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg // J. Peptide Science. – 1995. – Vol. 3. – P. 175–183.
3. 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. журнал. – 2005. – Т. 39, № 6. – С. 39–43.
4. Synthesis of protected pseudopeptides from dicarboxylic amino acids by Mitsunobu condensation / N. P. Boyarskaya, D. I. Prokhorov, Yu. G. Kirillova, E. N. Zvonkova, V. I. Shvets // Tetrahedron Lett. – 2005. – Vol. 46, № 43. – P. 7359–7362.
5. Tam, J. P. Mechanism for the removal of benzyl protecting groups in synthetic peptides by trifluoromethanesulfonic acid – trifluoroacetic acid – dimethyl sulfide / J. P. Tam, W. F. Heath, R. B. Merrifield // J. Am. Chem. Soc. – 1986. – Vol. 108. – P. 5242–5251.
6. Гершкович, А. А. Химический синтез пептидов / А. А. Гершкович, В. К. Кибирев – Киев: Наукова думка, 1992. – 360 с.