

УДК 547.466 + 547.854.4

СИНТЕЗ ПОЛИКАТИОННОГО ПЕПТИДНОГО АНАЛОГА ОЛИГОДЕЗОКСИТИМИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Кван Чул Хюн

(кафедра химии природных соединений)

Осуществлен синтез нового пептидного поликатионного аналога олигодезокситимидиловой кислоты на основе д-орнитинового декамера, а именно: 5-N-(L-фенилаланил)-дека-5-N-[2'-N-(тиминил-1-аланил)-L-орнитил-L-аланина.

В последнее десятилетие возросло число работ в области синтеза аналогов олигонуклеотидов как в целях применения их в качестве потенциальных терапевтических средств для антисенсовой терапии, так и для молекулярно-биологических исследований [1]. Однако несмотря на большой успех в этой области и на множество модификаций структур олигонуклеотидов, остается актуальной задачей создание новых аналогов олигонуклеотидов, обладающих необходимыми антисенсовыми свойствами (высокой специфичностью и прочностью связывания с комплементарными последовательностями, устойчивостью к нуклеазной деградации, способностью проникать через клеточную мембрану, отсутствием токсичности и др.).

Среди наиболее перспективных аналогов олигонуклеотидов выделяются полиамидные аналоги ДНК, в которых сахарофосфатный остов заменен на электронейтральную псевдопептидную цепь. Эти аналоги получили название «пептидонуклеиновых кислот» (ПНК) (рис. 1) [2]. Несмотря на лидирующее положение этих аналогов среди других модифицированных олигонуклеотидов, они имеют некоторые недостатки, ограничивающие их применение в медицинской практике, такие как, например, слишком высокая устойчивость к действию протеолитических ферментов

организма и связанная с этим повышенная токсичность. Поэтому поиск новых структур олигонуклеотидов, в которых углеводофосфатная цепь была бы заменена на другую, устойчивую к действию нуклеаз, но способную подвергаться протеолизу под действием ферментов, является важной задачей этой области исследований.

В продолжение исследований [3] в настоящей работе проводили разработку метода синтеза олигонуклеопептида (ОНП) (рис. 1), в котором сахарофосфатный остов заменен на истинную пептидную цепь. В задачу входило исследование олигомеров орнитина, содержащих остатки нуклеоаминокислоты – L-3-(тимин-1-ил)аланина (Tal).

В настоящей работе описан синтез нового аналога декадезокситимидиловой кислоты, содержащего пептидную цепь на основе дека- α -орнитина, в котором α -аминогруппы модифицированы остатками нуклеоаминокислоты Tal (рис. 2). Кроме того, с N-конца пептид фланкировали Phe, с C-конца – Ala. Присутствие катионных групп в ОНП частично нейтрализует отрицательный заряд олигонуклеотидов и тем самым улучшает проникновение в клеточную мембрану.

Первый этап нашей работы заключался в получении оптически активного L-3-(тимин-1-ил)аланина. Следующий

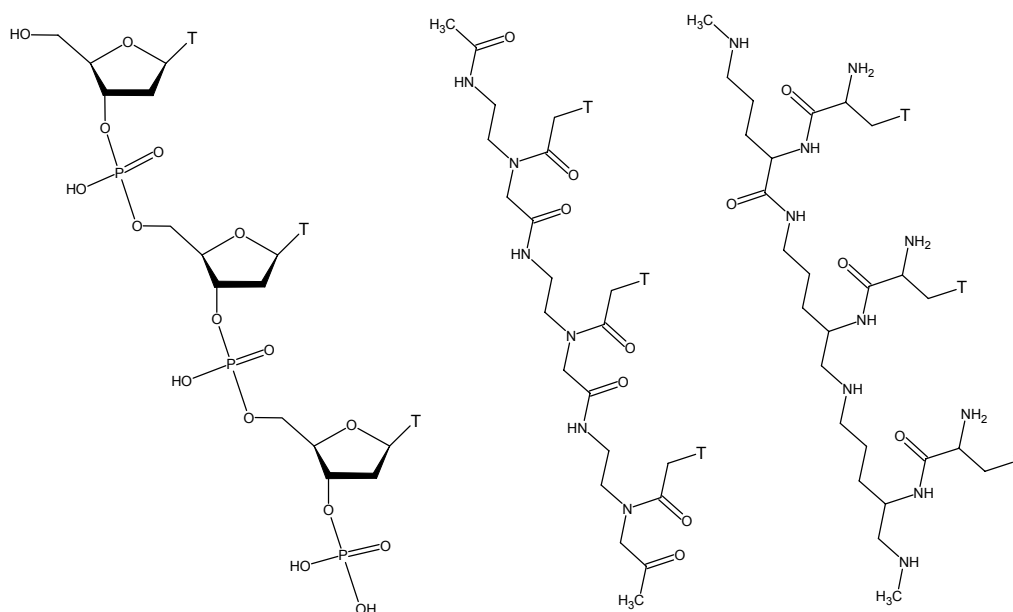


Рис. 1

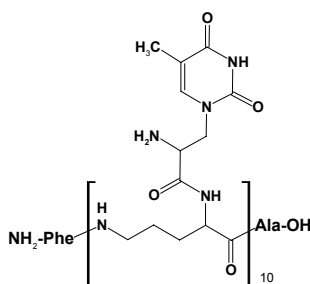


Рис. 2

этап работы включал синтез протяженных гомонуклеопептидов орнитина. Как правило, при синтезе достаточно длинных пептидов используют твердофазный метод синтеза н(ТФМС) [4]. Схема синтеза представлена на рис. 3.

В качестве твердофазного носителя использовали смолу, содержащую 4-(гидроксиметил)фенилацетамидометильную якорную группировку (РАМ) [5], модифицированную аланином. Нарастивание полипептидной цепи проводили, начиная от С-концевого остатка по направлению к N-концу. Для синтеза использовали *трет*-бутилоксикарбонильную (ВОС)-стратегию, которая в настоящее время наиболее широко применяется наряду с (FMOC)-стратегией, использующей щелочелabileную – флуоренилметилоксикарбонильную (FMOC) N-защитную группу [6] и позволяющей применять кислотолabileные группы для защиты боковых функций аминокислот. ВОС группу вводили в L-3-(тимин-1-ил)аланин с помощью ди-*трет*-бутилпирикарбоната [7]. Эта защитная группа легко отщепляется безводной трифторуксусной кислотой либо 4 н. раствором HCl в диоксане. Пептидный синтез проводили в ручном варианте. Реакции сочетания выполняли с использованием гексафторфосфата О-(бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония (НВТУ) [8]. Были применены 5-кратные избытки карбоксильной компоненты. Полноту реакции сочетания на каждом шаге проверяли при помощи теста Кайзера [9]. Полученные пептиды отщепляли от полимерного носителя трифторметансульфокислотой. Затем пептиды подвергали очистке гель-фильтрацией на сефадексе и на ВЭЖХ. Чистота конечного соединения доказывалась данными аминокислотного анализа гидролизата пептида, который показал наличие всех аминокислотных остатков в соотношении, соответствующем составу пептида.

Экспериментальная часть

2-N-(Тимин-1-ил)аланин [11]. Разделение рацемата на оптические антиподы и получение ВОС производного L-изомера проводили по ранее описанным методикам [12].

2-N-FMOC-5-N-ВОС-L-орнитин. В двугорлой колбе, снабженной обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой, суспендировали 3,25 г (14 ммоль) тонко измельченного d-ВОС-L-орнитина в 33 мл сухого метилхлорида и при энергичном перемешивании вносили 4,7 мл (27,2 ммоль) диизопропилэтиламина. Затем добавляли 3,5 мл (28 ммоль) триметилхлорсилана и кипятили раствор в течение 1,5 ч. После охлаждения реакционной смеси на бане со льдом добавляли 2,4 г (9,3 ммоль)

FMOC-хлорида в один прием, перемешивали в течение 20 мин при охлаждении и оставляли в течение 1,5 ч нагреваться до комнатной температуры. Упаривали растворитель на роторном испарителе и распределяли остаток между 30 мл эфира и 100 мл 2,5%-го раствора бикарбоната натрия. Водную фазу промывали (2×10 мл) эфиром, а эфирные вытяжки экстрагировали водой (2×10 мл). Объединенные водные слои подкислили 1 н. соляной кислотой до pH 2 и экстрагировали (3×30 мл) этилацетатом. Этилацетатные вытяжки сушили сульфатом натрия, фильтровали, удаляли растворитель и остаток перекристаллизовывали из смеси этилацетат-петролейный эфир (1:5). Выход: 2,6 г (63% от теоретического) $T_{\text{пл}} = 109-116^{\circ}$. Масс-спектр m/z^{+} : 454, рассчитано 454,5. ($C_{25}H_{30}N_2O_6$). 1H ЯМР (ацетон) δ 7,85 (d, 2H, H₄, H₅), δ 7,72 (d, 2H, H₁, H₈), δ 7,42 (m, 2H, 3H, H₆), δ 7,94 (m, 2H, H₂, H₇), δ 6,55 (sbr, 4H, NH-CHCOOH-), δ 5,79 (sbr, 1H, NH-CHCOOC(CH₃)₃), δ 4,37 (d, 2H, CH₂OCNH-), δ 4,27 (m, 2H, CH-(COOH)NH- и H₉), δ 3,14 (m, 2H, CH₂-NH-CHCOOC(CH₃)₃), δ 2,00–1,40 (4H, CH₂CH₂-CHCOOH), δ 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃OCO).

Дека-2-N-[2'-N-FMOC-L-орнитил]-L-аланил-РАМ-полимер

Подготовка растворов и реагентов для ТФМС. Раствор № 1: 50% CF₃COOH/CH₂Cl₂. Раствор № 2: 1,36 г FMOC-Orn(ВОС) в 30 мл DMF (0,1 М), содержащий 0,075 мл N-метилморфолина. Раствор № 3: 0,967 г НВТУ/30 мл DMF (0,085 М). Раствор № 4: 0,95 мл уксусного ангидрида + 1,1 мл N-метилморфолина в 30 мл DMF.

Протокол твердофазного синтеза.

- 1) Снятие ВОС-группы (раствор № 1, 5 мл, 2×2 мин).
- 2) Промывка CH₂Cl₂ (10 мл, 1×1 мин).
- 3) Промывка DMF/CH₂Cl₂ (10 мл, 2×1 мин).
- 4) Процедура сочетания: к полимеру прибавляют последовательно по 3 мл раствора № 2 и раствора № 3, встряхивают в течение 30 мин.
- 5) Тест Кайзера: после 4-й стадии небольшое количество смолы вносили стеклянным шпателем в пробирку и промывали смесью EtOH:AcOH (1:1). Добавляли по капле 1-го, 2-го и 3-го реагентов для теста Кайзера и нагревали 5 мин при 100°. О полноте прохождения реакции судили по отсутствию окрашивания смолы и раствора в синий цвет.
- 6) Промывка DMF / CH₂Cl₂ (10 мл, 2×1 мин).
- 7) Ацетилирование Ac₂O (раствор №4, 5 мл, 30 мин).
- 8) Промывка DMF/CH₂Cl₂ (10 мл, 2×1 мин).

После снятия ВОС-группы получили пептидполимер следующего строения: 5-N-(2-N-FMOC-Orn)₁₀-Ala-Pam. Аминокислотный анализ: Ala 1,30 (1), Orn 9,75 (10).

Модификация олигоорнитина включала реакцию образования пептидных связей между α -аминогруппами орнитиновых остатков и карбоксиллом тиминилаланина. Предварительно к FMOC-защищенному декаорнитилаланилполимеру для уточнения расчета данных аминокислотного анализа был присоединен остаток ВОС-фенилаланина, после чего FMOC-группы были удалены в обычных условиях.

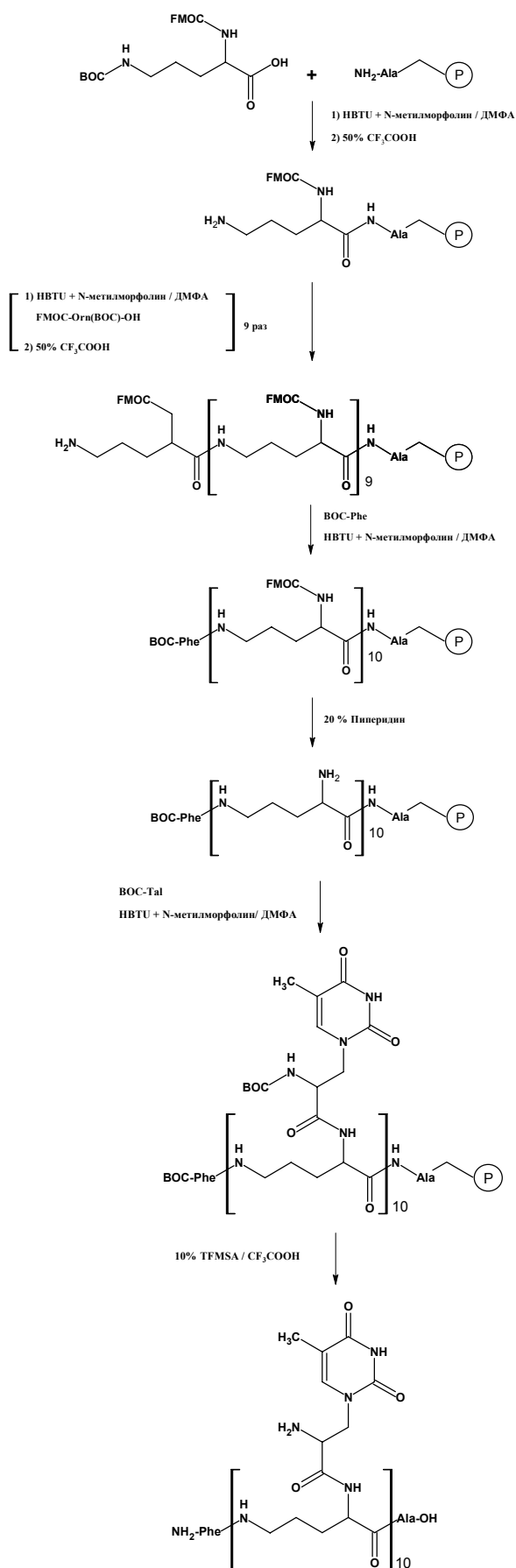


Рис. 3

5-N-(L-фенилаланил)-дека-5-N-[2'-N-(тиминил-1-аланил)-L-орнитил]-L-аланина

К 50 мг 5-N-(2-N-FMOC-Orn)₁₀-Ala-Pam присоединили остаток BOC-Phe-OH процедурой сочетания с HBTU. FMOC-группы снимали, как описано выше. Затем к BOC-Phe-пептидилполимеру присоединяли BOC-Tal-OH, используя 50-ти кратный избыток реагентов (5-кратный в расчете на одну свободную аминогруппу). BOC-группы снимали обработкой пептидилполимера трифторуксусной кислотой, содержащей 5% триптофана. Отщепление пептида от ПАМ полимера проводили обработкой 50 мг последнего смесью TFA и TFMSA (9:1) в течение 1 ч. Упаривали на роторном испарителе. После этого ОНП был очищен на смоле Sephadex G-10 в 1 М AcOH. Окончательная очистка пептида выполнялась на ВЭЖХ. Полученную сложную смесь пептидов удалось разделить при использовании 0,05–0,1%-й гептафтормасляной кислоты (HFBA) в качестве добавки к ацетонитрилу. Очистку проводили на колонке *Diasorb 130 C₁₈T* (250×15 мм, 7,5 μ) с использованием линейного градиента следующей системы: 0,2% TFA + 0,1% HFBA в воде (система 1) – 0,1% TFA + 0,05% HFBA в ацетонитриле (система 2), от 0 до 30% системы 1 в системе 2 в течение 20 мин. Детекция выполнялась при 215 и 260 нм. Выход пептида 0,2 ммоль (10% от теоретического). Аминокислотный анализ: Phe 1,00 (1), Tal 9,5 (10), Orn 10,5 (10), Ala 1,03 (1)

Таким образом, в результате проведенного исследования осуществлен синтез пептидного аналога олигодезокситимидиловой кислоты на основе олигоорнитина, модифицированного тиминилаланином. В настоящее время изучаются комплементарные свойства полученного аналога с соответствующей последовательностью природной адениловой кислоты. Автор выносит благодарность за научное руководство докт. хим. наук Г.А. Коршуновой и канд. хим. наук Н.В. Сумбатьян.

Работа выполнялась при поддержке РФФИ (грант № 0004-48312).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zamecnik D.C., Stephenson M.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1978. **75**. P. 280.
2. Nielsen E., Egholm M., Berg R.N., Buchard O. // Science 1991. **254**. P. 1497.
3. Sumbatyan N., Heun K.-C., Korshunova G. First International Peptide Symposium IPS 97 Program & Abstracts. P. 104.
4. Merrifield R.B. // J. Amer. Chem. Soc. 1963. **85**. P. 2149.
5. Tam J.P., Kent S.B. H., Wang I.W., Merrifield R.B. // Synthesis 1979. **12**. P. 955.
6. Fields C.G., Noble R.L. // Int. J. Pept. Prot. Res. 1990. **35**. P. 161.
7. Позднеев В.Ф. // ХПС. 1974. С. 764.
8. Fields C.G., Lloyd D.H., Mac Donald R.L., Otteson K.M., Noble R.L. // Peptide Res. 1991. **4**. P. 95.
9. Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger G.D., Cook P.I. // Anal. Biochem. 1970. **34**. P. 594.
10. Tam J.P., Heath W.F., Merrifield R.B. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. **108**. P. 5242.
11. Doel M.T., Jones A.S., Taylor N. // Tetrahedron Lett. 1969. P. 2285.
12. Швачкин Ю.П., Воскова Н.А., Семилетов Ю.А., Коршунова Г.А., Купцова О.С., Яковлева И.В. // 1977. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. **18**. С. 482.