

С. Н. Ярмолюк, Л. С. Король, И. В. Алексеева, А. С. Шаламай

**ОЛИГОНУКЛЕОПЕПТИДЫ\*. II.****СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДИЛ-(P→N)-ПЕПТИДОВ****С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОКИСЛИТЕЛЬНО-****ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО РЕАГЕНТА — СМЕСИ****ТРИФЕНИЛФОСФИНА И 2,2'-ДИПИРИДИЛДИСУЛЬФИДА**

*Изучена реакция образования P→N-связи при синтезе олигонуклеопептидов фосфамидного типа с использованием окислительно-восстановительного реагента — трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида в присутствии различных нуклеофильных катализаторов. Реакция особенно чувствительна к основности аминогруппы пептидов, наилучшие выходы получены с пептидами, pKa которых ≤ 9. Синтезированы олигонуклеопептиды фосфамидного типа как по 3'-, так и по 5'-положению олигонуклеотида.*

**Введение.** Нуклеопептиды фосфамидного типа используются для моделирования узлов связывания белково-нуклеиновых структур [1]. Активный поиск усовершенствованных методов синтеза подобных соединений проведен в лаборатории З. А. Шабаровой [2]. Конденсацию проводили дициклогексилкарбодимидом (DCC) в органических растворителях или в водноорганической смеси [3] водорастворимым карбодимидом [4]. Несмотря на некоторые недостатки, эти способы активно используются при синтезе аминокислотных и пептидных производных нуклеотидов.

Олигонуклеопептиды (ОНП) в последнее время находят применение как химические зонды, маркеры, аффинные реагенты [6, 7]. Поэтому актуальным стал поиск высокоэффективных и специфических реагентов для их синтеза. При наличии в молекулах нуклеотидов и пептидов значительного количества реакционноспособных функциональных групп эти реагенты должны быть достаточно селективными. Этим требованиям, на наш взгляд, отвечает окислительно-восстановительный конденсирующий реагент (ОВКР) — смесь трифенилфосфина (Ph<sub>3</sub>P) и 2,2'-дипиридилдисульфида (Py<sub>2</sub>S<sub>2</sub>), который использовался для получения фосфамидов олигонуклеотидов [8].

Ранее нами установлена принципиальная возможность использования ОВКР для синтеза ОНП фосфамидного типа [9]. В этой работе сделана попытка проанализировать течение реакции, образование побочных продуктов и очертить границы использования ОВКР для получения олигонуклеотидил-(P→N)-пептидов.

**Материалы и методы.** Синтез пептидов описан ранее в [9]. Метилловые эфиры аминокислот получены по [10]. Олигонуклеотиды синтезированы, как описано в [11]. В работе использованы 2,2'-дипиридилдисульфид («Fluka», Швейцария), трифенилфосфин («Chemarol», Чехо-Словакия), N-метилимидазол (MeIm) («Ega», ФРГ). Обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) олигонуклеотидов и ОНП осуществляли на колонке Lichrosorb BR-18 (4,6×120 мм, «LKB», Швеция) с использованием градиента концентрации ацетонитрила в 0,05 М перхлорате лития; ионообменную ВЭЖХ — на колонке TSK DEAE 5PW (4×7,5 мм, «Toyo Soda», Япония) в 0,01 М трис-HCl (pH 3,7) в градиенте концентрации NaCl на хроматографе GOLD System («Beckman», США). Капиллярный электрофорез проводили на приборе P/AC System 2000 («Beckman», США) (размеры капилляра 75 мкм×57 см; рабочий раствор — 20 мМ трициновый буфер, pH 9,0, 15 кВ; 25 °С). Процентное содержание компонентов реакционных смесей рассчитывали по соотношению площадей соответствующих пиков электрофореграмм.

Структуру синтезированных ОНП подтверждали ВЭЖХ продук-

\* Приставка «дезокс» в обозначениях олигонуклеотидов опущена.

тов частичного кислотного и щелочного гидролизом, аминокислотным анализом на анализаторе Biotronic 5001 (ФРГ).

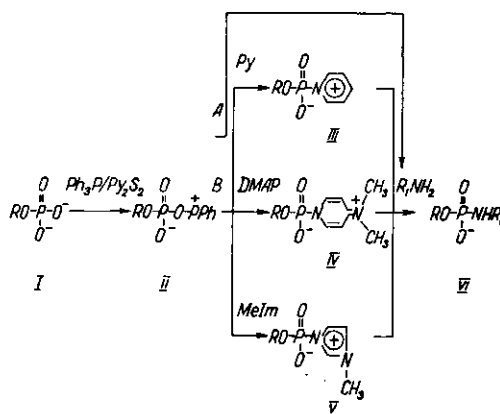
Метилловые эфиры олигонуклеотидил-(P→N)-пептидов (аминокислот). В 75 мкл абсолютного диметилсульфоксида растворяли последовательно 10 ОЕ<sub>260</sub> цетавлоновой соли олигонуклеотида, 5 мкл MeIm, 5 мг Рu<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, 6 мг Ph<sub>3</sub>P. Через 5 мин к образовавшемуся активному производному олигонуклеотида добавляли предварительно полученный метиловый эфир пептида (аминокислоты) (0,12 ммоль) в 25 мкл диметилформамида (ДМФА). Нуклеотидный материал через 25 мин осаждали из реакционной смеси 2 %-м раствором перхлората лития в ацетоне. Продукт реакции выделяли с помощью ВЭЖХ.

Олигонуклеотидил-(P→N)-пептиды. 10 ОЕ<sub>260</sub> олигонуклеотида активировали, как описано выше. Активное производное осаждали абсолютным эфиром и использовали для реакции с раствором пептида в воде или ДМФА.

Подготовка к реакции пептида (аминокислоты), их метиловых эфиров: а) к 0,12 ммоль аминокислоты добавляли 0,12 ммоль тетрабутиламмонийгидроксида (40 %-й водный раствор). Образованную соль высушивали в вакуум-эксикаторе, растворяли в 100 мкл ДМФА и переосаждали абсолютным эфиром. Раствор полученного масла в 30 мкл ДМФА добавляли к реакционной смеси; б) 0,12 ммоль гидрохлорида метилового эфира пептида растворяли в 0,5 мл абсолютного метилового спирта, добавляли 0,18 ммоль триэтиламина и высушивали в вакуум-эксикаторе. Высушенный остаток растворяли в 30 мкл ДМФА, центрифугировали и супернатант вносили в реакционную смесь.

**Обсуждение результатов.** Синтез амидов моно- и полифосфатов с помощью ОВКР детально изучен Кнорре с сотр. [12]. Опираясь на данные <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии, был установлен механизм реакции образования P→N-связи.

При этом протекание реакции может происходить двумя путями, которые определяются присутствием или отсутствием катализаторов. На первой стадии с участием ОВКР происходит активация моноэфира фосфата. При наличии в реакционной смеси нуклеофильных реагентов (Py, DMAP, MeIm) идет образование промежуточных высокореакционных цвиттерионных амидофосфатов III—V, которые реагируют с нуклеофильными аминными компонентами [14] (схема).



Реакция чувствительна к сильным основаниям и заканчивается в их присутствии образованием симметричного пирофосфата. Использование ОВКР без катализатора дает возможность легко фосфорилировать слабоосновные амины. Присутствие же катализатора затрудняет реакцию со слабоосновными и делает ее возможной с более основными аминами [9, 14].

N-Концевые аминогруппы пептидов принадлежат к аминам средней основности ( $pK_a \approx 9,0$ ). Поэтому синтез олигонуклеотидил-(P→N)-пептидов, на наш взгляд, целесообразно проводить в присутствии нуклеофильного катализатора. Это предположение явно подтверждается данными выходов продуктов реакции, приведенными в табл. 1.

Реакционная способность промежуточных фосфамидов III—V уменьшается от пиридинового до DMAP-производного. Нами установлено, что для синтеза ОНП можно использовать каждый из трех катализаторов. Но при введении в реакцию аргининсодержащих пептидов с солевой защитой гуанидиновых групп желательнее использовать MeIm, который обеспечивает наилучший выход целевого продукта (табл. 2).

Из экспериментальных данных видно (табл. 3), что изменение основности пептидов существенно влияет на ход реакции, изменяя качественный состав реакционных смесей. Так, лучше всего конденсация

Таблица 1

Анализ реакционных смесей синтеза пептидных производных *pCGTCCTC* фосфамидного типа, проведенный с помощью капиллярного электрофореза

Пептид	Нуклеофильный катализатор	Длительность реакции, ч	Состав реакционной смеси, %			
			ОНП	Олигонуклеотид	Симметричный пирофосфат	Неизвестные продукты
Gly-Gly-OMe	MeIm	0,5	52,7	13,5	33,8	—
Gly-Gly-OMe	—	2,0	26,0	37,2	10,8	26,0
Arg-OMe	MeIm	0,5	45,2	18,4	19,1	17,3
Arg-OMe	—	2,0	32,1	32,2	28,3	7,4

Таблица 2

Анализ реакционных смесей синтеза *OMe-Arg-Ahx-pCGTCCTC* с использованием разных катализаторов методом капиллярного электрофореза

Нуклеофильный катализатор	Состав реакционной смеси, %			
	ОНП	Олигонуклеотид	Симметричный пирофосфат	Неизвестные продукты
Pu	12,2	30,8	17,8	39,2
MeIm	14,4	33,7	48,4	—
DMAP	12,5	53,1	34,4	—

Таблица 3

Анализ реакционных смесей синтеза пептидных производных *pCGTCCTC* фосфамидного типа, проведенный с помощью капиллярного электрофореза ( $pK_a$  аминокислот из [15])

Пептид, аминокислота	$pK_a$ $\alpha$ -аминогруппы N-концевой аминокислоты*	Состав реакционной смеси, %			
		ОНП	Олигонуклеотид	Симметричный пирофосфат	Неизвестные продукты
Pro-Arg-Val-OMe	10,2	50,5	28,0	21,5	—
Gly-Gly-OMe	9,6	52,7	13,5	33,8	—
Arg-OMe	9,0	42,2	17,1	17,5	23,2
Ahx-OMe	10,7	35,6	35,9	28,5	—
Ahx-Arg-OMe	10,8	27,3	32,7	40,0	—
Ahx-Arg-Arg-OMe	10,8	10,3	45,1	30,4	14,2

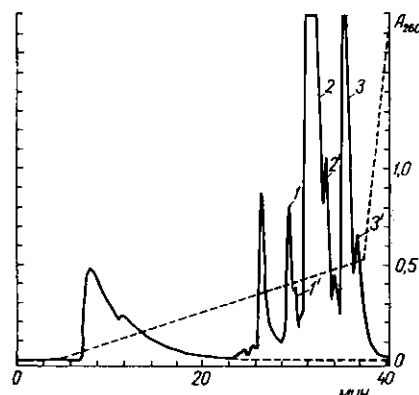
\* Участие карбоксильной группы в образовании пептидной связи влияет на основные свойства аминогруппы. Реальные  $pK_a$  уменьшены более чем на единицу для  $\alpha$ -аминогрупп и 1/2 единицы для  $\delta$ - и  $\epsilon$ -аминогрупп.

идет с пролинсодержащим пептидом, метиловыми эфирами глицилглицина и аргинина. С пептидами, содержащими неприродную  $\epsilon$ -аминокапроновую кислоту (Ahx), выход побочного продукта (симметричного пирофосфата) превышает выход ОНП. Хотя ранее было показано, что амиды алифатических аминов образуются практически количественно при использовании ОВКР и MeIm [14].

Нами установлено, что двойное увеличение триэтиламина относительно расчетного количества приводит к 20–30 %-му снижению выхода ОНП. Исходя из этих соображений, мы использовали методику, предусматривающую минимальное введение триэтиламина в реакционную смесь.

Приведенные примеры свидетельствуют о протекании конкурентных

Профиль ОФХ реакционной смеси, полученной в результате синтеза TrTrTr-Ahx-Arg-OMe (1—TrTrTr; 2—TrTrTr-5'-5'-pTrTrT; 3—TrTrTr-Ahx-Arg-OMe; 1'-3'-5'-S-алкилтиопроизводные соответственно 1—3)



процессов, непосредственно связанных с основностью используемых пептидов. Значительное увеличение «общей» основности пептида приводит к смещению равновесия реакции в сторону образования симметричного пирофосфата и снижению выхода ОНП [12]. С другой стороны, рост стабильности конечного продукта реакции — фосфамида VI определяет увеличение выхода ОНП. Так, например, пролиновый пептид, имея высокую основность, но образуя при этом самый стойкий фосфамид среди всех использованных пептидов [1], дает наилучший выход ОНП.

Одной из побочных реакций является также замещение свободных оксигрупп углеводородных остатков нуклеозидов, в первую очередь в 5'-положении, на 2'-тиопиридиновые остатки [16]. Как правило, для синтеза фосфамидов олигонуклеотидов использовались их 5'-фосфаты. При наличии свободных 3'-гидроксильных групп в олигонуклеотидах побочного алкилтиолирования не наблюдалось [9, 13, 14]. Не зарегистрировано оно и нами при синтезе олигонуклеотидил-(5'→N)-пептидов.

Учитывая низкую способность 5'-гидроксила тимидина образовывать 5'-S-алкилтиопроизводные [17], нами была сделана попытка получить олигонуклеотидил-(3'→N)-пептиды без предварительной защиты 5'-конца олигонуклеотида. Однако в рамках предложенной методики синтеза ОНП, которая предусматривает проведение конденсации в течение непродолжительного времени (30 мин), все-таки происходит 5'-алкилтиолирование. Это подтверждается данными ОФХ (рисунки), где модификации подвергается весь состав реакционной смеси и относительная часть тиопроизводных составляет 18%. Разделение таких смесей затруднено при использовании ОФХ, и практически его можно осуществить для ОНП, синтезированных на основе коротких олигонуклеотидов.

Попытки синтезировать ОНП непосредственной конденсацией незащищенного пептида с 3'-фосфорилированным олигонуклеотидом в растворе карбоната натрия (рН 11) или с тетрабутиламмониевой солью пептида в абсолютном ДМФА оказались неудачными. Выходы основного продукта были низкими, а в первом случае наблюдалось образование модифицированных производных неизвестного строения. В связи с этим ОНП со свободной карбоксильной группой целесообразно получать омылением триэтиламинам сложноеэфирных производных ОНП [9]. Реакции идут количественно и без особых затруднений.

Таким образом, проведен синтез ОНП с фосфамидным типом связи как по 3'-, так и по 5'-положению олигонуклеотида с использованием конденсирующего агента — смеси трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида в присутствии нуклеофильных агентов пиридина, 4-диметиламинопиридина, N-метилимидазола. Показано, что на протекание реакции, образование ОНП и побочных продуктов непосредственное влияние оказывают как нуклеофильные катализаторы, так и основные свойства аминогрупп пептида и положение концевых фосфатов.

Summary. We studied the formation of P-N bond in the oligonucleopeptides of phosphoramidate type with use of oxidation-reduction reagent — triphenylphosphine, 2,2'-dipyridyldisulfide in the presence of various nucleophilic agents. Reaction depended on pKa of aminogroup of peptides. Highest yields were obtained using peptides with pKa about 9. The method allows to prepare oligonucleopeptides both at 3'- and 5'-terminal phosphate groups.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Юодка Б. А. Ковалентные белково-нуклеиновые структуры и их химическое моделирование. — Вильнюс: Моклас, 1985. — 176 с.
2. Синтез фенилаланилового амида пентадезоксинуклеотида / В. Д. Смирнов, М. Г. Ивановская, Е. В. Ильина и др. // Докл. АН СССР. — 1987. — 206, № 5. — С. 1113—1136.
3. Moffat J. G., Khorana H. G. Nucleoside polyphosphates X. The synthesis and some reactions of nucleoside-5'-phosphoromorpholidates and related compounds. Improved methods for the preparation of nucleoside-5'-polyphosphate // J. Amer. Chem. Soc. — 1961. — 83, N 3. — P. 649—658.
4. Ivanovskaya M. G., Gottich M. B., Shabarova Z. A. Modification of oligo(poly)nucleotide phosphomonoester groups in aqueous solution // Nucleosides and Nucleotides. — 1987. — 6, N 5. — P. 913—934.
5. Зарытова В. Ф., Райт В. К., Черникова Т. С. Действие активирующих реагентов на межнуклеотидные связи в полирибонуклеотиде // Биоорг. химия. — 1977. — 3. — С. 1626—1631.
6. Uhlmann E., Peumann A. Antisense oligonucleotide: a new therapeutic principle // Chem. Rev. — 1990. — 90, N 4. — P. 564—584.
7. Naralambidis I., Duncan L., Tregear G. W. The solid phase synthesis of oligonucleotides containing a 3'-peptide moiety // Tetrahedron Lett. — 1987. — 28, N 43. — P. 5199—5202.
8. Mukaiyama T., Hashimoto M. Synthesis of oligothymidylates and nucleoside cyclic phosphates by oxidation-reduction condensation // J. Amer. Chem. Soc. — 1974. — 94, N 24. — P. 8528—8532.
9. Синтез олигонуклеотидил-(5'→N)-пептидов, содержащих аргинин / В. Ф. Зарытова, Е. М. Иванова, С. Н. Ярмолюк, И. В. Алексеева // Биополимеры и клетка. — 1989. — 4, № 4. — С. 220—222.
10. Гершкович А. А., Кибирев В. К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. — Киев: Наук. думка, 1987. — 264 с.
11. Ярмолюк С. Н., Пальчиковская Л. И., Федоряк Д. М. Химический синтез производных нуклеозидов и нуклеотидов // Методы молекуляр. биологии. — Киев: Наук. думка, 1986. — С. 41—47.
12. Активация моно- и динуклеотидов смесью трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида / Д. Г. Кнорре, Г. Ф. Мишенина, В. В. Самуков, Т. Н. Шубина // Докл. АН СССР. — 1977. — 236, № 3. — С. 613—619.
13. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Селективная модификация монозамещенных фосфатных групп в 5'-моно- и полифосфатах нуклеозидов и олигонуклеотидов // Биоорг. химия. — 1979. — 5, № 6. — С. 886—894.
14. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. Реакционноспособные фосфамиды моно- и олигонуклеотидов // Там же. — 1986. — 12, № 4. — С. 475—481.
15. Дюга Г., Пенни К. Биоорганическая химия. Химические подходы к механизму действия ферментов. — М.: Мир, 1983. — 510 с.
16. A combined use of triphenyl phosphite and 2,2'-dipyridyl diselenide as a coupling reagent in oligonucleotide synthesis / H. Takaku, Y. Shimada, Y. Nakajima, T. Hata // Nucl. Acids Res. — 1976. — 3. — P. 1233—1248.
17. Nakagawa I., Hata T. A convenient method for the synthesis of 5'-S-alkylthio-5'-deoxyribonucleosides // Tetrahedron Lett. — 1975. — N 17. — P. 1409—1412.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики  
АН Украины, Киев

Получено 01.04.92