



УДК 547.963.3:577.113.6.088.53:543.422.25

СЕЛЕКТИВНАЯ СТАБИЛИЗАЦИЯ АТ-БОГАТЫХ ДНК-ДУПЛЕКСОВ КОНЬЮГАТАМИ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ И АНАЛОГОВ ДИСТАМИЦИНА

© 1997 г. А. Н. Синяков[#], В. А. Рябинин, С. В. Серегин, С. Г. Лохов*,
И. В. Кутявин**, Х. Б. Гэмпер**, Р. Б. Мейер**

Институт молекулярной биологии ГНЦ ВБ "Вектор", 633159, пос. Кольцово Новосибирской обл.;

*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск;

**Эпох фармасетикалс, Базел, штат Вашингтон, США

Поступила в редакцию 10.07.96 г. Принята к печати 30.01.97 г.

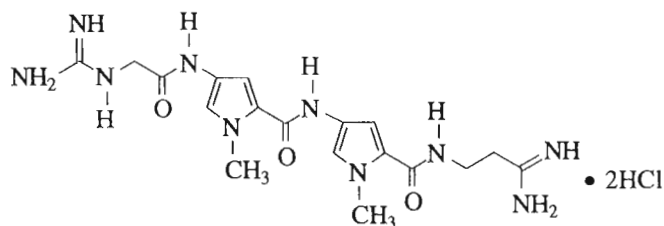
Получены конъюгаты олигодезоксирибонуклеотидов и аналогов дистамицина, содержащих до пяти карбоксамидопиррольных фрагментов. Показано, что стабильность дуплексов, образованных этими конъюгатами, возрастает в соответствии с количеством карбоксамидопиррольных фрагментов в молекуле лиганда. Стабилизация дуплекса осуществляется и одной и двумя молекулами лиганда. При этом на примере дуплекса, образованного конъюгатами октатимидилата и октаадениллата с пентапиррольным аналогом дистамицина, показано, что комплекс, содержащий две молекулы лиганда, обладает существенно большей стабильностью.

Ключевые слова: дистамицин, олигодезоксирибонуклеотиды, конъюгаты, стабильность дуплексов, селективность, малая бороздка.

В последнее десятилетие интенсивно дебатруется проблема создания небелковых молекул, способных путем взаимодействия со специфическими сайтами ДНК вызывать желаемый биологический ответ. А priori такие лиганды должны обладать меньшей селективностью по сравнению с белками, но ряд особенностей, таких, как варьирование в широких пределах структуры, возможность химического синтеза, стабильность в присутствии литических ферментов и т.д., делает перспективными их исследование и применение. Идея создания лигандов, связывающихся с произвольной желаемой нуклеотидной последователь-

ностью, реализовалась в концепции лекситропсина [1]. Анализ механизма узнавания сайтов ДНК позволил заключить [2], что наиболее реально конструирование таких лигандов на основе неинтеркалирующих соединений, связывающихся с ДНК в малой бороздке.

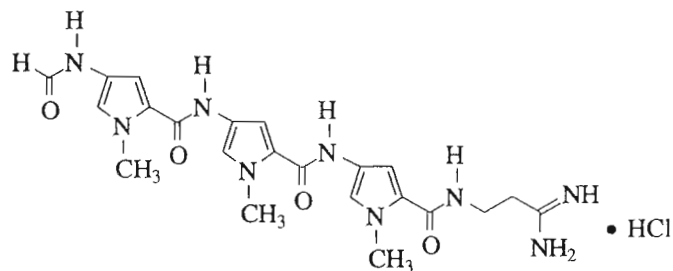
Список известных к настоящему времени малобороздочных лигандов достаточно велик (см., например, [3, 4]). Это нетропсин, дистамицин А, беренил, Hoechst 33258, пентамидин, митрамицин и другие соединения. Наиболее предпочтительными представляются нетропсин и дистамицин А, их аналоги и производные.



Нетропсин

Сокращения: (PyS)₂ – 2,2'-дипиридилдисульфид, DMAP – 4-диметиламинопиридин, H₂Ot – 1-гидроксибензотриазол, MPC_n – пептидный остаток, содержащий n карбоксамидопиррольных звеньев.

[#] Автор для переписки (тел.: (383-2) 64-78-87, факс: +7(383-2) 32-88-31, e-mail: Sinyakov@vector.nsk.su).



Дипептидин А

Для такого рода пептидов, содержащих в молекуле пятичленный ароматический цикл, характерно увеличение сайта связывания на одну пару оснований при введении в пептид одного дополнительного пятичленного фрагмента [5]. Эти данные позволяют предположить, что возможно создание протяженного пептида, способного специфично связываться с протяженными участками ДНК. Длина уникальной последовательности составляет для человеческого генома 15–16 п. о. [6]. Для создания пептида, способного взаимодействовать со столь протяженной последовательностью, необходимо решить ряд задач, основной из которых является соответствие геометрических параметров лиганда и малой бороздки ДНК – соответствие их кривизны и их копланарность. Для протяженных пептидов важна проблема “фазировки” звеньев ДНК и звеньев синтетического пептида, так как по мере роста длины пептида отклонения от оптимальных расстояний, необходимых для образования водородных связей, будут возрастать. При создании пептида необходимо будет решать проблему универсальных “блоков”, каждый из которых будет специфично связываться с А • Т- или Г • С-парой.

К настоящему времени достигнут несомненный прогресс в области установления структуры комплексов ДНК с малобороздочными лигандами, механизма их взаимодействия, получения биологически активных веществ на основе малобороздочных лигандов. Однако более чем 6-звенные пептиды не были получены [5]. Напротив, в работе [7] указывается на уменьшение эффективности связывания синтетических пептидов, содержащих в своей цепи более 5 карбоксамидопиррольных фрагментов. В целом представляется сомнительным, что можно конструировать лиганды, способные селективно связываться с любым желаемым фрагментом ДНК длиной в 15–16 п. о. Если такой лиганд является полипиррольным пептидом, то энергия взаимодействия его с ДНК будет составлять, по нашим оценкам и данным работы [8], 25–30 ккал/моль. Поэтому в

реальных условиях в клетке процесс поиска таким лигандом мишени будет очень медленным. Иными словами, длинные пептиды будут взаимодействовать с ДНК неселективно. Кроме того, синтезу и применению протяженных пептидов будет препятствовать их плохая растворимость как в воде, так и в органических растворителях.

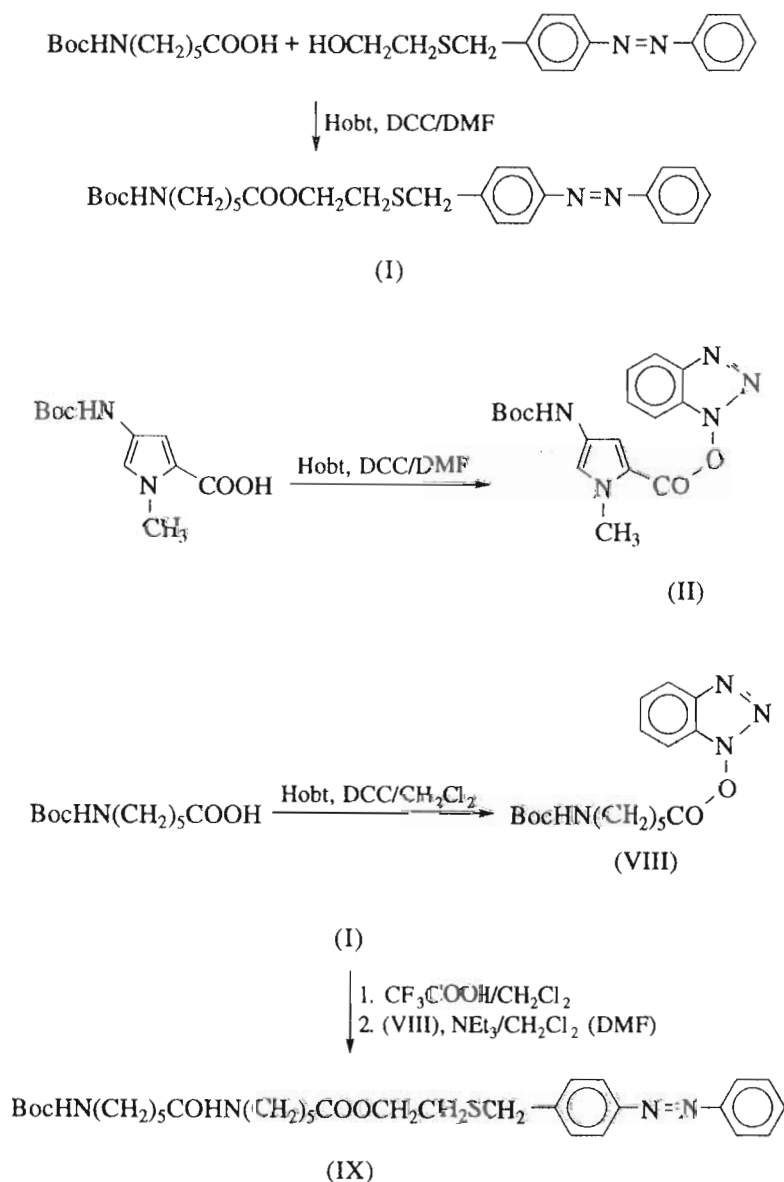
Нам представляется перспективной идея использования в молекулярной биологии конъюгатов олигодезоксирибонуклетидов с лигандами, связывающимися в малой бороздке ДНК. Область приложения этих соединений может быть очень широкой: ингибиторы транскрипции и репликации вирусов; ингибиторы трансляции (антисенс-олигонуклеотиды); антигенные олигонуклеотиды. Применение таких конъюгатов позволит, по-видимому, решить ряд проблем: 1) достичь высокой селективности связывания конъюгатов с мишенями как за счет специфичности связывания самого олигонуклеотида, так и благодаря высокому сродству малобороздочных лигандов к определенным сайтам; 2) значительно стабилизировать комплексы этих конъюгатов с ДНК-мишенью, что обусловлено большими константами ассоциации малобороздочных лигандов с ДНК (10^6 – 10^9 M⁻¹) [9, 10].

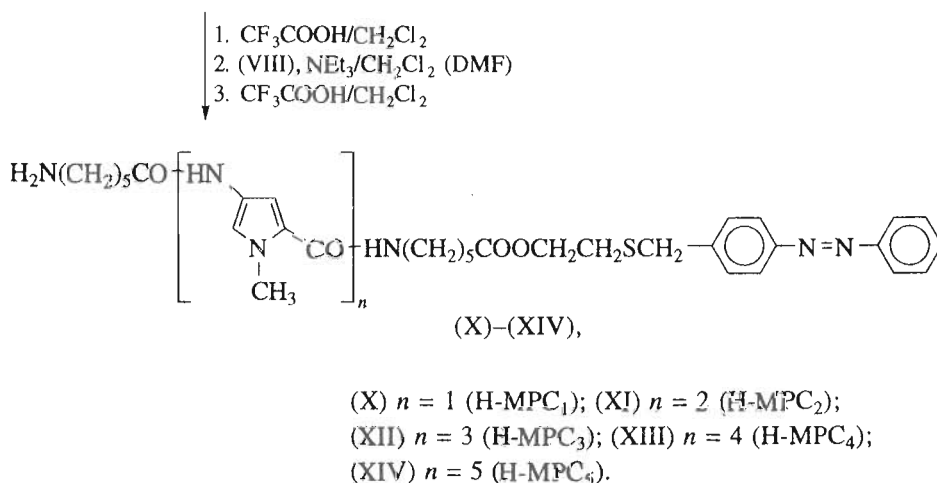
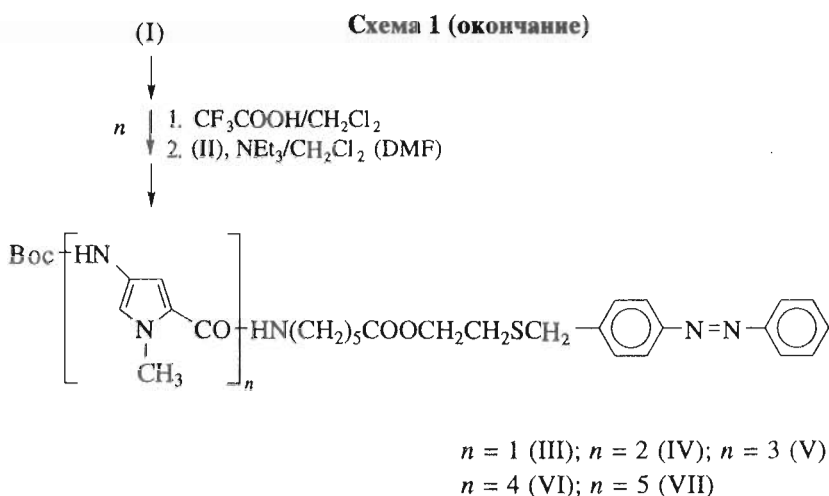
Существуют малобороздочные лиганды, связывающиеся с определенными сайтами либо только в ДНК–ДНК-дуплексах [11], либо как в ДНК–ДНК-, так и в ДНК–РНК-гибридах [12]. Известны примеры стабилизации малобороздочными лигандами триплексов [13]. Поэтому возможен подбор в каждом конкретном случае своего специфического лиганда. Можно ожидать, что конъюгаты олигонуклеотидов с малобороздочными лигандами будут обладать большей способностью к транспорту внутрь клеток по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами, поскольку сами лиганды легко проникают как в клетки [14], так и в клеточное ядро [15].

Цель настоящей работы – синтез и изучение свойств конъюгатов олигонуклеотидов с аналогами дистамицина А. Прежде всего нами были синтезированы олигомеры 1-метил-4-аминопиррол-2-карбоновой кислоты (III)–(VII), содержащие от одного до пяти звеньев [16] (схема 1). Ключевым интермедиатом для последовательного наращивания цепи служил бензотриазол-1-иловый эфир 1-метил-4-(*tert*-бутилоксикарбониламино)пиррол-2-карбоновой кислоты (II) [17]. Каждый цикл наращивания цепи включает обработку олигопептидов трифторуксусной кислотой, вызывающую частичное разрушение пир-

рольного цикла. Это обстоятельство в сочетании с довольно низкой нуклеофильностью 4-аминогруппы пиррольного фрагмента приводит к умеренным выходам целевых продуктов. Для облегчения идентификации и выделения продуктов в них через аминоксаноильную ножку введена хромофорная 2-[4-(фенилазо)бензилтио]этильная группа. В качестве спейсера для последующей привязки к олигодезоксирибонуклеотидам использована 6-аминоксаноильная группа. Продукты выделяли хроматографией на силикагеле. Структуру полученных соединений подтверждали спектрами $^1\text{H-NMR}$.

Схема 1

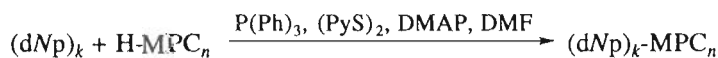




Конъюгаты олигонуклеотидов с олигопептидами получали сочетанием активированных олигоде-

зоксирибонуклеотид-3'-фосфатов с алифатической аминогруппой соединений (IX)–(XIV) [18] (схема 2).

Схема 2



Цетавлоновые соли 3'-фосфата олигодезоксирибонуклеотида и 3',5'-дифосфата p(dTp)₁₆ в DMF активировали, используя смесь трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида. Конъюгаты выделяли из реакционных смесей с помощью ВЭЖХ (см., например, рис. 1). Гомогенность полученных препаратов подтверждалась данными гель-электрофореза, аналитической ВЭЖХ и электронной спектроскопии (рис. 2). По данным электрофореза, полученные конъюгаты являются индивидуальными соединениями, причем увеличение количества пиррольных фрагментов в пептидной части конъюгата вызывает снижение его подвижности (рисунок не приведен).

При определении температуры плавления конъюгатов (dTp)₁₆-MPC_n, гибридованных с poly(dA) (таблица), во всех случаях концентрации аденозинных и тимидиновых остатков были равны и составляли 2 × 10⁻⁴ М. В этих условиях нет оснований ожидать образования триплексов по следующим причинам: во-первых, (dAp)₁₉ и (dTp)₁₉ не образуют триплексов в 0.2 М NaCl даже в тех случаях, когда использовалось соотношение (dAp)₁₉ : (dTp)₁₉, равное 1 : 2 [19], во-вторых, сам нетропсин значительно дестабилизирует триплекс poly(dT) • poly(dA) • poly(dT) [20]. Нами также не было обнаружено, что конъюгаты (dTp)₈ с

Температуры плавления и термодинамические параметры конъюгатов дуплексов $(dTrp)_{16} \cdot poly(dA)$ и $(dTrp)_8 \cdot (dAp)_8$ с MPC-пептидами

Дуплекс*	$T_{пл}, ^\circ C$	$\Delta T_{пл}, ^\circ C^{2*}$	$\Delta G (37^\circ C), \text{ ккал/моль}$	$K, M^{-1} (37^\circ C)^{3*}$
$(dTrp)_{16}-(IX) + poly(dA)$	49.2			—
$(dTrp)_{16}-MPC_n + poly(dA)$ $n = 1$	49.5	0.3		—
	2	5.1	—	—
	3	11.0	—	—
	4	13.7	—	—
	5	19.8	—	—
$MPC_4-p(dTrp)_{16}-MPC_4 + poly(dAp)$	63.5	14.3		—
$(dAp)_8 + (dTrp)_8$	21.1	—	-4.0	7×10^2
$(dAp)_8 + (dTrp)_8 + \text{дистамицин}^{4*}$	47.1	26.0	—	—
$(dAp)_8 + (dTrp)_8-MPC_n$ $n = 2$	39.4	18.3	-7.0	9×10^4
	3	30.6	-9.5	5×10^6
	4	39.1	-11.9	2×10^8
	5	44.3	-12.7	9×10^8
$(dTrp)_8 + (dAp)_8-MPC_n$ $n = 2$	29.1	8.0	-5.4	7×10^3
	3	17.9	-6.9	7×10^4
	4	21.6	-7.4	2×10^5
	5	31.5	-8.8	2×10^6
$(dTrp)_8 - MPC_4 + (dAp)_8-MPC_5$	83.0	61.9	-15.7	1×10^{11}

* Измерения проводили в 0.2 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM NaH_2PO_4 (pH 7.3). Во всех случаях концентрация $(dTrp)_{16}$ и $poly(dAp) - 2 \times 10^{-4}$ M в расчете на основание, концентрация $(dTrp)_8 \cdot (dAp)_8 - 2.5 \times 10^{-5}$ M.

²* Разность температур плавления модифицированного и немодифицированного дуплексов.

³* Константа образования дуплекса.

⁴* Концентрация дистамицина 2.5×10^{-5} M.

малобороздочными лигандами образуют T • A • T-триплексы с $poly(dA)$ в 10 mM $MgCl_2$, 140 mM KCl и 20 mM HEPES-HCl (pH 7.0).

В то время как сама хромофорная группа и одно пиррольное звено с хромофорной группой не влияли на величину температуры плавления дуплекса, пептиды с двумя и более пиррольными звеньями прогрессивно увеличивали ее (таблица). Так, пентапептид повышал температуру плавления дуплекса на $20^\circ C$. Следует отметить, что комплекс, образованный конъюгатом $MPC_4-p(dTrp)_{16}-MPC_4$, содержащим тетрапептид как на 3'-, так и на 5'-концах олигонуклеотида, и $poly(dA)$, не обладает большей стабильностью по сравнению с комплексом, образованным конъюгатом, не содержащим пептид на 5'-конце (см. таблицу). Вероятно, это связано с тем, что оба пептидных остатка взаимодействуют с малой бороздкой ДНК независимо друг от друга.

Для более точной оценки эффекта стабилизации A • T-дуплексов полипиррольными пептидами нами синтезированы серии $(dTrp)_8$ - и $(dAp)_8$ -конъюгатов, в которых число пиррольных звеньев менялось от 1 до 5. Температура плавления и термодинамические параметры образования дуплексов содержатся в таблице. Как следует из дифференциальных кривых плавления дуплексов, образованных октатимидилатом и октаденилатом и их конъюгатами с пентапиррольным анало-

гом дистамицина (рис. 3), термостабильность дуплексов зависит от длины пептида. Как и в случае с $(dTrp)_{16}$, сама хромофорная группа и одно пиррольное звено с хромофорной группой не влияют на температуру плавления дуплекса (данные в таблице не приведены). При этом пептиды, находящиеся на 3'-конце $(dTrp)_8$, эффективнее стабилизируют дуплекс, чем пептиды, присоединенные к 3'-концу $(dAp)_8$. Пентапирролкарбоксамидный аналог дистамицина, связанный с $(dTrp)_8$, увеличивает температуру плавления дуплекса на $44.3^\circ C$, тогда как связанный с $(dAp)_8$ — на $31.5^\circ C$ (см. рис. 3). Эти различия обусловлены неэквивалентным расположением пептидных фрагментов относительно групп аденинового и тимидинового трактов. На примере дуплексов $(dAp)_8 \cdot (dTrp)_8$ видно, что введение пептидов резко увеличивает константу комплексообразования — так, остаток пентапептида в составе октаденилата увеличивает константу связывания примерно в 3000 раз, а аналогичные изменения в структуре октатимидилата — почти на 6 порядков.

Дуплекс $(dAp)_8-MPC_5 \cdot (dTrp)_8-MPC_5$, обе цепи которого образованы конъюгатами олигонуклеотидов с пентапептидами, имел температуру плавления $83.0^\circ C$. Такая высокая температура плавления дуплекса, по-видимому, связана с частичным перекрыванием пентапептидов и образованием комплекса, аналогичного по структуре комплексу ДНК-пептид состава 1 : 2. Ранее на

примере свободного дистамицина было показано [21], что комплексы такого состава обладают более высокой стабильностью, чем комплексы лишь с одним пептидом в малой бороздке ДНК. Для эффективной стабилизации дуплекса необходимо, чтобы пептиды в нём располагались друг относительно друга антипараллельно. По-видимому, невозможность перекрытия пептидов в более протяженном дуплексе в случае MPC₄-(dTrp)₁₆-MPC₄ на матрице poly(dA) и является причиной отсутствия дополнительной стабилизации.

Стабилизация дуплекса (dTrp)₈ • (dAp)₈ ковалентно связанными малобороздочными лигандами происходит значительно эффективнее, чем свободными лигандами или ковалентно связанными интеркалирующими агентами. Например, свободный дистамицин, который содержит положительно заряженную амидиновую группу, увеличивает температуру плавления этого дуплекса на 26,0°C [16], в то время как электростатически нейтральный трипептид, присоединенный к (dTrp)₈, повышает его температуру плавления на 30,6°C (таблица). Изученные конъюгаты более эффективны и по сравнению с интеркалирующими соединениями. Так, по данным работы [16], присоединение бромистого этидия к 3'-концу октаденилата дуплекса (dTrp)₈ • (dAp)₈ увеличивает температуру плавления на 9°C, что составляет 1,5 ккал/моль, в то время как энергия стабилизации конъюгатом, содержащим пентапептид, достигает 8,8 ккал/моль (см. таблицу).

Из приведенных данных видно, что конъюгаты исследованных пептидов, как и дистамицин, эффективно стабилизируют дуплексы, содержащие в своей основе А • Т-пары. Однако, как было показано в работе [16], наличие G • C-пар в дуплексе приводит к исчезновению стабилизирующего эффекта конъюгированного лиганда. Конъюгаты, содержащие полипиррольные лиганды, подобно свободному нетропсину и дистамицину не стабилизируют ДНК-РНК-гибриды. Так, дуплексы, образованные из poly(rA) и (dTrp)₁₆-MPC_n (n = 1-5), имеют температуру плавления, близкую к 23°C [16].

Таким образом, на специфичность и прочность связывания конъюгатов с ДНК существенное влияние оказывает целый ряд факторов: состав образующегося дуплекса, размер пептидного фрагмента, возможность взаимного перекрытия пептидных фрагментов и создания структуры, аналогичной структуре комплекса 1 : 2 для ДНК и свободного дистамицина. Полученные данные указывают на достаточно высокоспецифичное и прочное связывание конъюгатов олигодезоксирибонуклеотидов и аналогов дистамицина с комплементарными им олигонуклеотидами, что свидетельствует о возможном их применении в процессах с участием одноцепочечной ДНК.

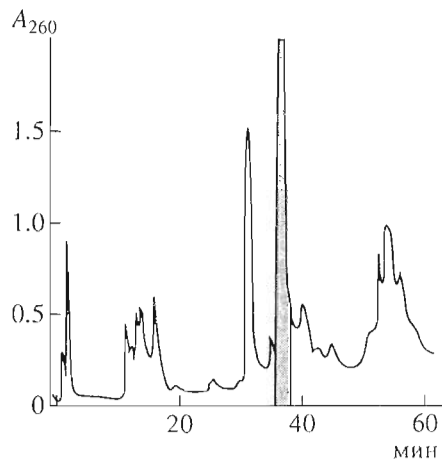


Рис. 1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционной смеси, полученной при взаимодействии (dTrp)₈ и соединения (XIV), на колонке (4,6 × 250 мм) LiChrosorb RP-18 (Merck, Германия) в 0,05 М LiClO₄ в градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 60% за 60 мин. Скорость элюции 1 мл/мин. Пик целевого продукта – (dTrp)₈-MPC₄ – затемнен.

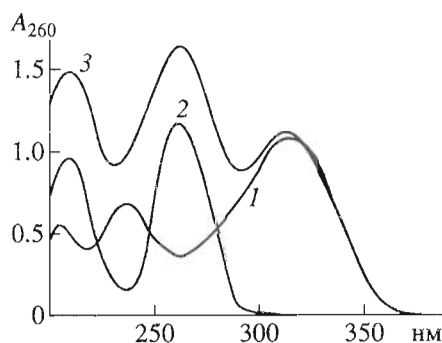


Рис. 2. Электронные спектры соединения (VII) (20 мкМ, СНCl₃) (1), октагимидилата (20 мкМ, Н₂О) (2) и конъюгата (dTrp)₈-MPC₅ (20 мкМ, Н₂О) (3).

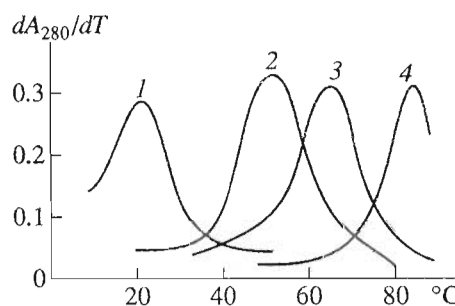


Рис. 3. Дифференциальные кривые плавления дуплексов (dAp) • (dTrp)₈ (1), (dAp)₈-MPC₅ • (dTrp)₈ (2), (dAp)₈ • (dTrp)₈-MPC₅ (3), (dAp)₈-MPC₅ • (dTrp)₈-MPC₅ (4). Концентрации олигонуклеотидов и состав буфера см. в “Экспер. части”.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерчески доступные реактивы и растворители, при необходимости подвергая их дополнительной очистке по стандартным методикам. Для колоночной хроматографии применяли силикагель L 40/100 (Lachema). Бензотриазол-1-илловый эфир 1-метил-4-(*трет*-бутилоксикарбониламино)пиррол-2-карбоновой кислоты (II) получали в соответствии с методикой [17]. Спектры ПМР регистрировали на спектрометре фирмы Bruker (200 МГц). Электронные спектры записывали на спектрофотометре фирмы Perkin-Elmer, модель 550.

2-[4-(Фенилазо)бензилтио]этиловый эфир 6-(*трет*-бутилоксикарбониламино)гексановой кислоты (I). К 4.16 г (18 ммоль) 6-(*трет*-бутилоксикарбониламино)гексановой кислоты добавляли 4.08 г (15 ммоль) 2-[4-(фенилазо)бензилтио]этанола в 25 мл DMF, реакционную смесь охлаждали льдом и добавляли 3.71 г (18 ммоль) DCC и 1.83 г (15 ммоль) DMAP, перемешивали 2 ч при охлаждении, затем 4 ч при комнатной температуре, оставляли на ночь при 6°C. Упариванием с бутилацетатом удаляли DMF, добавляли этилацетат (150 мл) и экстрагировали 30 мл 0.7 н. HCl и 100 мл 5% NaHCO₃, затем водой. Органический слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали. Осадок промывали эфиром. Выход 6.91 г (89%). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м. д.): 7.91 (м, 4H), 7.52 (м, 5H), 4.48 (т, 2H), 4.34 (с, 2H), 3.20 (т, 2H), 3.08 (м, 2H), 2.35 (т, 2H), 1.64–1.2 (м, 7H), 1.41 (с, 9H). Электронный спектр (CHCl₃), λ_{max} (ε, М⁻¹ см⁻¹): 320 нм (7200).

2-[4-(Фенилазо)бензилтио]этиловый эфир 6-[1-метил-4-(*трет*-бутилоксикарбониламино)пиррол-2-карбонил]аминогексановой кислоты (III). К 0.73 г (1.5 ммоль) соединения (I) при 0°C добавляли 5 мл охлажденной CF₃COOH, выдерживали 20 мин (контроль ТСХ, SiO₂, бутилацетат), затем несколько раз упаривали с CHCl₃, растворяли в 15 мл CH₂Cl₂, добавляли 0.59 г (1.65 ммоль) соединения (II) и 0.6 мл NEt₃ (4.5 ммоль) и перемешивали 5 мин. Разбавляли 20 мл CHCl₃, промывали 5% NaHCO₃ (2 × 20 мл) и H₂O (2 × 20 мл), сушили над Na₂SO₄, упаривали до объема 3 мл и хроматографировали на 50 мл SiO₂ (элюент – CHCl₃). Выход 0.88 г (91.8%). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м. д.): 7.88 (м, 4H), 7.46 (м, 5H), 6.74 (с, 1H), 6.38 (с, 1H), 6.26 (с, 1H), 5.87 (т, 1H), 4.18 (т, 2H, J 6 Гц), 3.82 (с, 3H), 3.79 (с, 2H), 3.3 (м, 2H), 2.63 (т, 2H, J 6 Гц), 2.30 (т, 2H, J 6 Гц), 1.64–1.2 (м, 6H), 1.46 (с, 9H). Электронный спектр (CHCl₃), λ_{max} (ε, М⁻¹ см⁻¹): 320 нм (20600).

2-[4-(Фенилазо)бензилтио]этиловый эфир 6-[1-метил-4-[1-метил-4-(*трет*-бутилоксикарбониламино)пиррол-2-карбонил]аминопиррол-2-карбонил]аминогексановой кислоты (IV). Аминосоединение, полученное из 2.43 г продукта (III) по методике, описанной выше (8 мл CH₂Cl₂, 4 мл CF₃COOH, 60 мин, 20°C), растворяли в 10 мл CH₂Cl₂, добавляли 1.43 г (4 ммоль) соединения (II) и 1.5 мл (11 ммоль) NEt₃ и перемешивали 5 мин. Реакционную смесь обрабатывали и хроматографировали по методике, приведенной выше. Выход 1.95 г (66.8%). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м. д.): 7.87 (м, 4H), 7.46 (м, 5H), 7.04 (д, 1H, J 1.5 Гц), 6.77 (уш. с, 1H), 6.52 (уш. с, 1H), 6.50 (д, 1H, J 1.5 Гц), 6.31 (уш. с, 1H), 5.95 (т, 1H), 4.19 (т, 2H, J 6 Гц), 3.85 (с, 6H), 3.78 (с, 2H),

3.32 (м, 2H), 2.64 (т, 2H, J 6 Гц), 2.31 (т, 2H, J 6 Гц), 1.64–1.2 (м, 6H), 1.48 (с, 9H). Электронный спектр (CHCl₃), λ_{max} (ε, М⁻¹ см⁻¹): 313 нм (28800).

2-[4-(Фенилазо)бензилтио]этиловый эфир 6-[1-метил-4-[1-метил-4-[1-метил-4-(*трет*-бутилоксикарбониламино)пиррол-2-карбонил]аминопиррол-2-карбонил]аминогексановой кислоты (V). Аминосоединение, полученное из 1.90 г (2.6 ммоль) продукта (IV) по методике, описанной выше (6 мл CH₂Cl₂, 3 мл CF₃COOH, 60 мин, 20°C), растворяли в 5 мл CH₂Cl₂, добавляли 2.0 мл NEt₃ и 1.40 г (3.9 ммоль) соединения (II) и выдерживали 1 ч при 20°C. Реакционную смесь обрабатывали по методике, приведенной выше, и хроматографировали на 50 мл SiO₂, используя градиент метанола 0 → 1.5% в CHCl₃. Выход 1.56 г (70.5%), R_f 0.3 (SiO₂; CHCl₃-CH₃OH, 20 : 1). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м. д.): 7.87 (м, 4H), 7.68 (уш. с, 1H), 7.60 (уш. с, 1H), 7.46 (м, 5H), 7.08 (уш. с, 2H), 6.78 (уш. с, 1H), 6.56 (д, 1H, J 1.5 Гц), 6.60 (уш. с, 1H), 6.55 (д, 1H, J 1.5 Гц), 6.03 (т, 1H), 4.18 (т, 2H, J 6 Гц), 3.86 (м, 9H), 3.78 (с, 2H), 3.32 (м, 2H), 2.63 (т, 2H, J 6 Гц), 2.30 (т, 2H, J 6 Гц), 1.64–1.2 (м, 6H), 1.48 (с, 9H). Электронный спектр (CHCl₃), λ_{max} (ε, М⁻¹ см⁻¹): 313 нм (36800).

2-[4-(Фенилазо)бензилтио]этиловый эфир 6-[1-метил-4-[1-метил-4-[1-метил-4-(*трет*-бутилоксикарбониламино)пиррол-2-карбонил]аминопиррол-2-карбонил]аминогексановой кислоты (VI). Аминосоединение, полученное из 0.32 г (0.32 ммоль) продукта (V) по методике, описанной выше (5 мл CH₂Cl₂, 2.5 мл CF₃COOH, 60 мин, 20°C), растворяли в 1 мл CH₂Cl₂, добавляли 0.1 мл NEt₃ и 0.11 г (0.32 ммоль) соединения (II) и перемешивали 1.5 ч при 20°C. Реакционную смесь обрабатывали и хроматографировали по методике, приведенной выше. Выход 250 мг (80%). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м. д.): 8.17 (уш. с, 1H), 7.98 (уш. с), 7.96 (уш. с, 1H), 7.85 (м, 4H), 7.44 (м, 5H), 7.09 (уш. с, 2H), 7.02 (с, 1H), 6.78 (уш. с, 1H), 6.74 (уш. с, 1H), 6.66 (с, 1H), 6.58 (с, 3H), 6.29 (т, 1H), 4.18 (т, 2H, J 6 Гц), 3.78 (м, 14H), 3.28 (м, 2H), 2.60 (т, 2H, J 6 Гц), 2.26 (т, 2H, J 6 Гц), 1.64–1.2 (м, 6H), 1.48 (с, 9H). Электронный спектр (CHCl₃), λ_{max} (ε, М⁻¹ см⁻¹): 312 нм (44400).

2-[4-(Фенилазо)бензилтио]этиловый эфир 6-[1-метил-4-[1-метил-4-[1-метил-4-[1-метил-4-(*трет*-бутилоксикарбониламино)пиррол-2-карбонил]аминопиррол-2-карбонил]аминопиррол-2-карбонил]аминогексановой кислоты (VII). Аминосоединение, полученное из 0.65 г (0.67 ммоль) продукта (VI) по методике, описанной выше (10 мл CH₂Cl₂, 5 мл CF₃COOH, 90 мин, 20°C), растворяли в 1 мл DMF, добавляли 0.18 мл NEt₃ и 0.24 г (0.67 ммоль) соединения (II) и перемешивали 3 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали досуха, растворяли в 2.5% DMF в CHCl₃ и хроматографировали на 50 мл SiO₂, используя градиент метанола 0 → 2.5% в CHCl₃-DMF (40 : 1). Выход 670 мг (45%). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м. д.): 8.35 (с, 1H), 8.20 (уш. с, 1H), 8.12 (уш. с, 2H), 8.02 (уш. с, 1H), 7.98 (уш. с, 1H), 7.86 (м, 4H), 7.45 (м, 5H), 7.07 (уш. с, 2H), 7.00 (с, 1H), 6.80 (уш. с, 1H), 6.75 (уш. с, 1H), 6.62 (с, 1H), 6.58 (с, 3H), 6.30 (т, 1H), 4.20 (т, 2H, J 6 Гц), 3.80 (с, 15H), 3.78 (с, 2H), 3.30 (м, 2H), 2.58 (т, 2H, J 6 Гц), 2.26 (т, 2H, J 6 Гц), 1.64–1.2 (м, 6H), 1.48 (с, 9H). Электронный спектр (CHCl₃), λ_{max} (ε, М⁻¹ см⁻¹): 312 нм (51500).

Бензотриазол-1-илловый эфир 6-(трет-бутилокси-карбониламино)гексановой кислоты (VIII). Смесь 4.46 г (19.3 ммоль) 6-(трет-бутилоксикарбониламино)гексановой кислоты, 2.87 г (21.2 ммоль) 1-гидроксibenзотриазола и 4.78 г (23.2 ммоль) DCC в 50 мл CH_2Cl_2 перемешивали 2 ч при комнатной температуре. Осадок дидцлогексилмочевины отделяли фильтрованием, фильтрат упаривали. Получали 6.18 г (92%) продукта, который использовали без дополнительной очистки. ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м. д.): 7.40–7.91 (м, 4H), 2.25 (т, 2H, J 7 Гц), 2.16 (т, 2H, J 7 Гц), 1.28–1.67 (м, 6H), 1.22 (с, 9H).

N-6-Аминогексаноильные производные (IX)–(XIV). К 0.1 ммоль соединений (I), (III)–(VII) при 0°C добавляли 1 мл охлажденной CF_3COOH , выдерживали 20 мин (контроль ТСХ; SiO_2 , бутилацетат), затем несколько раз упаривали с CHCl_3 , растворяли в 5 мл CH_2Cl_2 , добавляли 0.11 ммоль соединения (VIII) и 0.3 ммоль NEt_3 . Реакционную смесь выдерживали 1 ч при 20°C, разбавляли 20 мл CHCl_3 , промывали 5% NaHCO_3 (2 × 20 мл) и H_2O (2 × 20 мл), сушили над Na_2SO_4 , упаривали досуха. С полученного соединения снимали Вос-защиту по методике, описанной выше, и получали соответствующие трифторацетаты N-6-аминогексаноильных производных (X)–(XIV), которые промывали эфиром, сушили и использовали для получения конъюгатов без дополнительной очистки.

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали по стандартной фосфамидитной методике на автоматическом синтезаторе фирмы Biosearch, модель 8700. 5'-Фосфорилированные олигодезоксирибонуклеотиды получали согласно методике [22]. 3'-Фосфорилированные олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали, используя носитель, содержащий 2-(2'-О-4,4'-диметокситритилоксиэтилсульфонил)этилсукциноильную группу (см. ниже).

Моно-[2-(2'-О-4,4'-диметокситритилоксиэтилсульфонил)этиловый] эфир янтарной кислоты (XV). 2.20 г (4.8 ммоль) 2-(2'-О-4,4'-диметокситритилоксиэтилсульфонил)этанола, полученного согласно [22], и 0.60 г DMAP упаривали трижды с 8 мл пиридина, прибавляли 0.60 г (5.8 ммоль) янтарного ангидрида и 8 мл абс. пиридина и перемешивали до полного растворения компонентов. Смесь выдерживали 24 ч при комнатной температуре, затем прибавляли 100 мл хлороформа, экстрагировали 1% лимонной кислотой (3 × 20 мл) и водой (2 × 50 мл). Хлороформный слой сушили Na_2SO_4 , упаривали, соупаривали с 10 мл сухого толуола. Получали 2.60 г (96%) эфира. ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м. д.): 6.80–7.40 (м, 13H), 4.53 (т, 2H, J 6 Гц), 3.77 (с, 6H), 3.63 (т, 2H, J 6 Гц), 3.47 (т, 2H, J 6 Гц), 3.17 (т, 2H, J 6 Гц), 2.62 (с, 4H).

3-Аминопропилированное стекло (1.0 г) фирмы Sigma с определенным размером пор (350 Å) и 0.22 г соединения (XV) соупаривали трижды с 3 мл абс. пиридина, прибавляли 0.34 г 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорида, 0.27 мл N-метилимидазола и 6 мл абс. пиридина, перемешивали 5 ч и оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Стекло отделяли фильтрованием, отмывали 15 мл пиридина и сушили. Непрореагировавшие аминогруппы ацилировали 30 мин при комнатной температуре смесью 1.2 мл уксусного ангидрида, 0.18 г DMAP и 1.1 мл абс. NEt_3 в 7 мл абс. ацето-

нитрила. Стекло фильтровали, отмывали 20 мл ацетонитрила и получали носитель с содержанием 52 ммоль соединения (XV) на 1 г стекла.

Конъюгаты олигонуклеотид–пептид. 10 OE_{260} олигодезоксирибонуклеотида, содержащего фосфатную группу на 3'-конце в случае октатимидилата и октаадезилата или 3'-, 5'-дифосфатного производного в случае гексадекатимидилата, растворяли в 50 мкл дистиллированной воды. К раствору прибавляли 8 мкл 8% водного раствора бромид гексадецилтриметиламмония, полученную суспензию центрифугировали, осадок сушили в течение ночи над SiO_2 в вакууме. К высушенной цетавлоновой соли олигодезоксирибонуклеотида прибавляли 10 мг 2,2'-дипиридилдисульфида, 10 мг трифенилфосфина, 10 мг 4-диметиламинопиридина, 2 мг соответствующего пептида и 100 мкл DMF. Реакционную смесь перемешивали 20 мин при 20°C, затем прибавляли 1.4 мл 2% раствора LiClO_4 в ацетоне, перемешивали и центрифугировали. Супернатант отделяли, осадок суспендировали в 1.5 мл 2% LiClO_4 и снова центрифугировали. Осадок растворяли в 1 мл воды и хроматографировали на хроматографе Altex (США) (типичная хроматограмма приведена на рис. 1). Фракцию, содержащую целевой конъюгат, упаривали до объема 50 мкл и разбавляли 1.5 мл ацетона. Суспензию центрифугировали. Осадок промывали ацетоном и сушили в вакууме. Выход целевого конъюгата 5–8 OE_{260} . Полученные конъюгаты имели электронные спектры, представляющие собой суперпозицию электронных спектров свободных олигонуклеотидов и пептидов (см. рис. 2).

Электрофоретический анализ конъюгатов проводили в 20% ПААГ в денатурирующих условиях (7 М мочевины, 10 мМ трис-борат, pH 8.3). Результаты анализа визуализировали радиоавтографией.

^{32}P -Меченые конъюгаты получали по методике [23], используя $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (2800 Ки/ммоль) и T4-поли-нуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78).

Растворы свободных олигонуклеотидов заданной концентрации в воде готовили разбавлением до определенного значения A_{260} (20°C), используя молярные коэффициенты поглощения, определенные по методике [24]. Водные растворы смешивали с концентрированным буферным раствором. Конечный состав буферной смеси: 1 М NaCl, 10 мМ NaH_2PO_4 , 0.1 мМ EDTA, pH 7.3. Концентрация олигонуклеотидов в растворе составляла 2.5×10^{-5} М. Аналогичным образом готовили растворы конъюгатов, определяя концентрацию по поглощению пептидной части молекулы в области 312–320 нм, где поглощение свободного олигонуклеотида отсутствует, используя молярные коэффициенты поглощения соединений (I), (III)–(VII).

Определение термодинамической стабильности ДНК-дуплексов. Оптические кривые плавления регистрировали на специальной установке, созданной на базе спектрофотометрического УФ-детектора жидкостного хроматографа "Милюхром". Установка имеет термостатированную кювету объемом 2 мкл. Температуру кюветы поддерживали за счет прокачивания теплоносителя жидкостным термостатом через кюветодержатель. Температуру измеряли медь-константановой термопарой, откалиброванной с абсолютной погрешностью 0.1°C и подключенной к цифровому вольтметру Щ-1516. Данные накапливали и обрабаты-

вали с помощью персонального компьютера IBM 386. Каждую экспериментальную точку получали интегрированием сигнала за 10 с. Каждая кривая плавления содержит 500–600 точек. Данные сглаживали центральной линейной интерполяцией в интервале 2°C, делали поправку на тепловое расширение воды. Скорость нагрева растворов во всех случаях составляла (0.6–0.7°C)/мин. Термодинамические параметры образования дуплексов определяли по оптическим кривым плавления по методике, приведенной в работе [24]. Исходя из полученных значений ΔH и ΔS рассчитывали величины ΔG и равновесную константу образования дуплекса (K), используя уравнения $\Delta G = \Delta H - \Delta ST$; $K = \exp(-\Delta G/RT)$.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта 96-04-49953.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kopka M.L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., Dickerson R.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 1376–1380.
2. Annual Reports in Medicinal Chemistry / Ed. R.C. Allen. N.Y.: Acad. Press, 1987. P. 259–268.
3. Lown J.W. // J. Mol. Recognit. 1994. V. 7. P. 79–88.
4. Geierstanger B.H., Wemmer D.E. // Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1995. V. 24. P. 463–493.
5. Dervan P.B. // Science. 1986. V. 232. P. 464–471.
6. Helen C., Toulme J.J. // Oligodeoxyribonucleotides: Antisense Inhibition of Gene Expression / Ed. J.S. Cohen. L.: McMillan Press, 1989. P. 137–182.
7. Lown J.W. // Antiviral Res. 1992. V. 17. P. 179–196.
8. Ueno A., Baek K., Jeone C., Agarwal K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 3676–3680.
9. Luck G., Triebel H., Waring M., Zimmer C. // Nucl. Acids Res. 1974. V. 1. P. 503–512.
10. Wartell R.M., Larson J.E., Wells R.D. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 6719–6731.
11. Young S.L., Krawczyk S.N., Mateucci M.D., Toole J.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 10023–10026.
12. Lukhtanov E.A., Kutyavin I.V., Gamper H.B., Meyer R.B. // Bioconj. Chem. 1995. V. 6. P. 418–426.
13. Pilch D.S., Breslauer K.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 9332–9336.
14. Grigoriev M., Praseuth D., Guieysse A.L., Robin P., Thuong N.T., Helene C., Harel-Bellan A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 3501–3505.
15. Baily C., Hein J.P. // Biochim. Biophys. Res. Commun. 1990. V. 167. P. 798–806.
16. Sinyakov A.N., Lokhov S.G., Kutyavin I.V., Gamper H.B., Meyer R.B., Jr. // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 4995–4996.
17. Grehn L., Ragnarsson U. // J. Org. Chem. 1981. V. 46. P. 3492–3497.
18. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Мальцева Т.В., Халимская Л.М. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. С. 1246–1252.
19. Kibler-Herzog L., Kell B., Zon G., Shinozuka K., Mizan S., Wilson W.D. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 3545–3555.
20. Park Y.-W., Breslauer K.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 6653–6657.
21. Geierstanger B.H., Mrksich M., Dervan P.B., Wemmer D.B. // Science. 1994. V. 266. P. 646–650.
22. Horn T., Urdea M.S. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 4705–4708.
23. Мазин А.В. // Методы молекулярной генетики и геной инженерии / Ред. Р.И. Салганик. Новосибирск: Наука, 1990. С. 25–29.
24. Лохов С.Г., Кошкин А.А., Кутявин И.В., Митянин М.П., Подыминогин М.Ф., Лебедев А.А. // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 197–205.

Selective Stabilization of AT-Rich DNA–DNA Duplexes by Oligodeoxyribonucleotide Conjugates with Distamycin Analogues

A. N. Sinyakov*, V. A. Ryabinin*, S. V. Seregin*, S. G. Lokhov**, I. V. Kutyavin***, H. B. Gamper***, and R. B. Mayer***

* Institute of Molecular Biology, Vector State Research Center for Biotechnology and Virology, pos. Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 633159 Russia

** Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

*** Epoch Pharmaceuticals, 1725 220th Street, SE Bothell, WA 98021 USA

Abstract—Oligodeoxyribonucleotide conjugates with distamycin analogues containing up to five pyrrolicarboxamide moieties were synthesized. The stability of duplexes formed by these conjugates was shown to depend directly upon the number of pyrrolicarboxamide moieties in the ligand molecule. For the duplexes formed by octaadenylate and octathymidilate conjugates with the distamycin pentapyrrole analogue, stability was demonstrated to be achieved by either one or two ligand molecules; however, duplexes containing two ligand molecules are more stable.

Key words: distamycin, oligodeoxyribonucleotides, conjugates, duplex stability, selectivity, minor groove