

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Халмуратов А. Г., Тоцкий В. И., Чаговец Р. В. Транспорт жирорастворимых витаминов.— Киев: Наук. думка, 1980.— 216 с.
2. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Чабаный Н. В. и др. Изменения белкового, липидного состава, ДНК- и РНК-полимеразной активности фракций хроматина и ядерного матрикса печени крысы в условиях Е-гиповитаминоза // Укр. биохим. журн. — 1990.— 62, № 6.— С. 22—30.
3. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г., Величко А. Н. Изменение структурного состояния фракционированного хроматина печени при активации перекисного окисления липидов // Биополимеры и клетка.— 1991.— 7, № 3.— С. 89—94.
4. Донченко Г. В., Петрова Г. В., Капранов А. А. и др. О возможной роли  $\alpha$ -токоферола в функционировании хроматина и ядерного матрикса печени крысы // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1990.— № 3.— С. 60—62.
5. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б. и др. Функциональная активность фракционированного хроматина печени крысы при однократном введении тетрахлорметана // Вопр. мед. химии.— 1989.— 35, № 4.— С. 119—124.
6. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. и др. Конформационные характеристики и характер упаковки эндогенных липидов фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина // Укр. биохим. журн.— 1991.— 63, № 2.— С. 83—89.
7. Свердлова О. В. Электронные спектры в органической химии.— Л.: Химия, 1985.— 248 с.
8. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело.— 1988.— № 1.— С. 16—18.
9. Аншария И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1975.— 78 с.
10. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Гольдштейн Н. Б., Литвиненко Л. Я. Перекисное окисление липидов и эндогенная ДНК-полимеразная активность фракций изолированного хроматина печени крысы // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1989.— 52, № 3.— С. 296—298.
11. Казначеев Ю. С., Кулагина Т. П., Маркевич Л. Н. и др. О метаболизме липидов хроматина печени и тимуса крысы // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 3.— С. 607—612.
12. Демченко А. П. Ультрафиолетовая спектроскопия и структура белков.— Киев: Наук. думка, 1981.— 208 с.
13. Сиволоб А. В., Храпунов С. Н. Флуоресцентная спектроскопия в исследованиях белково-нуклеиновых взаимодействий в хроматине // Биополимеры и клетка.— 1992.— 8, № 1.— С. 89—100.
14. Губский Ю. И., Бодескул А. Е., Примак Р. Г., Задорина О. В. Влияние  $\alpha$ -токоферола и нонола на физическую структуру мембран микросом печени крысы в условиях антиоксидантной недостаточности // Укр. биохим. журн.— 1989.— 61, № 4.— С. 94—99.

Укр. НИИ фармакологии и токсикологии МЗ Украины, Киев

Получено 21.09.92

УДК 547.963.32.057+547.92

**С. Н. Ярмолюк, Е. М. Иванова, М. Н. Овандер,  
И. В. Алексеева, А. С. Шаламай, В. Ф. Зарытова**

### **ОЛИГОНУКЛЕОПЕПТИДЫ. IV. СИНТЕЗ АЛКИЛИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДИЛ-(P→N)-ПЕПТИДОВ \***

*Синтезированы алкилирующие производные олигонуклеотидил-(P→N)-пептидов, которые могут быть использованы как реагенты для специфической модификации нуклеиновых кислот.*

**Введение.** Ковалентные конъюгаты антисмысловых олигонуклеотидов с липидами [1] или основными полипептидами [2] применяют для улучшения их проникновения через цитоплазматическую мембрану клетки.

\* Используются обозначения, рекомендованные номенклатурной комиссией IUPAC-IUB, префикс d в обозначениях олигонуклеотидов пропущен; Ahx —  $\epsilon$ -аминокапроновая кислота; DCC — дициклогексилкарбодимид; TEA — триэтиламин; DCM — дихлорметан; DMA — диметилформамид; DMAp — 4,4'-диметиламинопиридин; Py<sub>2</sub>S<sub>2</sub> — дипиридилдисульфид; Ph<sub>3</sub>P — трифенилфосфин; Melm — N-метилимидазол; EDTA — этилендиаминотetraуксусная кислота; AscO — ангидрид уксусной кислоты; TFA — трифтороуксусная кислота.

© С. Н. Ярмолюк, Е. М. Иванова, М. Н. Овандер, И. В. Алексеева, А. С. Шаламай, В. Ф. Зарытова, 1993

Эффективность такого подхода оценивается по косвенным признакам, в их числе снижение титра синтезируемого в клетке вируса, ингибирование синтеза вирусспецифических белков. Однако прямых доказательств того, что основные полиаминокислоты (например полилизин) действуют как своеобразные транспортные векторы, нет. Использование алкилирующих 4-(*N*-метил-*N*-2-хлорэтиламино)фенильных производных олигонуклеотидов позволяет отслеживать путь таких реагентов, выделять продукты модификации мишеней — нуклеиновых кислот.

Эффективность действия модифицированных олигонуклеотидов в значительной мере определяется транспортом подобных производных в клетку, а также их устойчивостью к действию клеточных нуклеаз. Существенное повышение устойчивости к ферментам достигается за счет введения в 5'- или 3'-положения последовательности наряду с алкилирующим фрагментом группировок, обладающих гидрофобными (холестериновые) или интеркалирующими (феназилиевые) свойствами [3].

Цель нашей работы заключалась в разработке подходов к синтезу олигонуклеопептидов (ОНП) фосфамидного типа, содержащих на своих концевых участках остаток пептида и 4-(*N*-метил-*N*-2-хлорэтиламино)фенильную группировку. Предполагалось, что использование пептидов различной природы (основных, гидрофобных, а также имеющих сродство к определенным клеточным рецепторам, например, фрагмент Pго-Arg-Val-, присутствующий в токсине змеиного яда [4]) позволит подобрать определенные структуры ОНП для улучшения захвата их клеткой. С другой стороны, можно ожидать, что наличие ковалентно присоединенных пептидных остатков будет способствовать существенному увеличению устойчивости алкилирующих производных олигонуклеотидов к действию нуклеаз.

**Материалы и методы.** Производные *L*-аминокислот, необходимые при синтезе, получены согласно [5]. Гомогенность всех пептидов и их производных определяли при помощи обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) на колонке Lichrosorb RP-18 (4,6×120 мм, «ЛКВ», Швеция) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1 %-й ТФА.

В работе использовали *n*-хлорфениловые эфиры, 2-цианэтиловые эфиры дитимидилатов и диаденилатов (НИБХ СО РАН), MeIm («Ega», ФРГ), 2,2'-дипиридилдисульфид («Fluka», Швейцария), трифенилфосфин («Chemapol», ЧСФР).

Кривые плавления комплементарных комплексов определяли в буферном растворе (0,1 М трис-HCl, 5·10<sup>-5</sup> М EDTA, pH 7,0). Изменение оптической плотности олигонуклеотидов регистрировали на спектрофотометре «Specord UV VIS» (ГДР) при 260 нм. Материалы нагревали в термостатированной ячейке со скоростью 0,25 °С/мин. Температуру плавления комплементарных комплексов определяли в точке, соответствующей половине максимального гиперхромного эффекта.

*Вос-Ahx-Trp-Trp-Trp-Gly* — полимер Меррифилда. *Вос*-глицил-полимер получали по методу [6] из хлорэтилированного стиролдвинилбензолного сополимера фирмы «Reanal» (Венгрия) (содержание хлоридов 7,1—9,2 %). Защищенный пептидил-полимер синтезировали из 2 г *Вос-Gly*-полимера (0,35 ммоль Gly на 1 г полимера), используя последовательность операций для каждого синтетического цикла, приведенную в таблице.

Симметричный ангидрид защищенной аминокислоты получали из 3 экв. *Вос*-аминокислоты и 1,5 экв. DCC в 20 мл 50 %-го DMFA в DCM при 0 °С. После перемешивания в течение 30 мин выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывали, раствор использовали для проведения реакции конденсации. Полноту протекания реакции контролировали с помощью нингидринового теста.

*Ahx-Trp-Trp-Trp-Trp-Gly-OMe*. Пептид отщепляли от полимера с помощью реакции переэтерификации. Пептидилполимер кинятили в смеси 45 мл абсолютного метанола и 6 мл ТЕА в течение 6—8 ч. Полученный продукт очищали хроматографией на силикагеле (Kieselgel 60, «Merck») в градиенте концентрации метанола в хлороформе. *Вос*-груп-

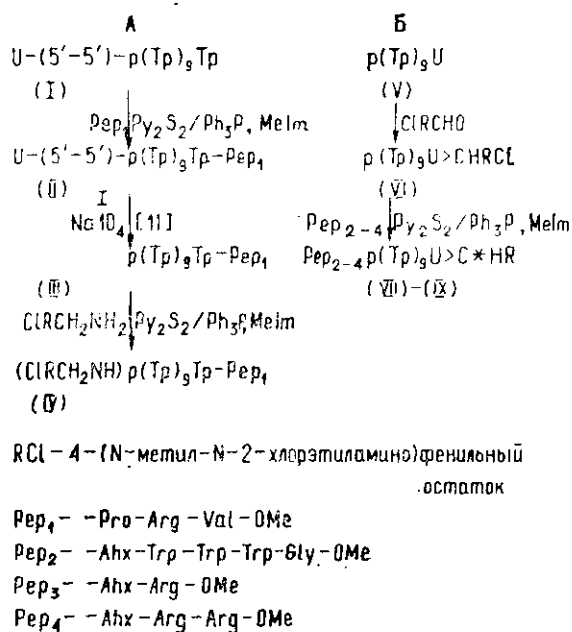
пу синнали 99,7 %-й муравьиной кислотой (15 мл, 3 ч). Гомогенность пептида определяли по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Аминокислотный состав Ahx (1,00); Gly (1,03); Trp (3,12). Выход 56 %.

Pro-Arg-Val-OMe, Ahx-Arg-OMe, Ahx-Arg-Arg-OMe синтезировали нами ранее [7, 8].

Олигонуклеотиды  $A_{16}$ ,  $U-(5' \rightarrow 5')-p(Trp)_3Trp, p(Trp)_3U$  получены фосфоритриэфирным методом из защищенных динуклеотидов [9]. Все олигонуклеотиды и их пептидные и алкилирующие производные выделены с помощью хроматографа «Altex-232» (США) на колонках  $10 \times 250$  мм. Для ионообменной хроматографии использовали носитель Partisil 10 SAX («Whatman», Англия), для ОФХ — Lichrosorb RP-18 («Merck», ФРГ).

Олигонуклеотидил-(P → N)-пептиды синтезированы по разработанной нами методике [10]. Присоединение пептидного остатка к олигонуклеотиду подтверждали ОФХ продуктов частичного кислотного и щелочного гидролизом, аминокислотным анализом продуктов полного кислотного гидролиза на анализаторе «Biotronic 5001» (ФРГ).

**Результаты и обсуждение.** Один из этапов наших исследований состоял в разработке методического подхода к получению гидрофобных пептидов методом твердофазного синтеза (см. таблицу). Из протокола синтеза модельного пептида Ahx-Trp-Trp-Trp-Gly-OMe следует, что обычно двукратной обработки пептидполимера симметричным ангидридом *Boc*-аминокислоты достаточно для практически количественного образования пептидной связи. Необходимо также отметить, что реакция переэтерификации для отщепления гидрофобных пептидов от полимера оказалась технически простой и удобной процедурой при получении кислотлабильного триптофансодержащего пептида. Учитывая гидрофобные свойства полностью защищенного пептида, для его очистки была применена колоночная хроматография на силикагеле.



Нами осуществлен синтез ОНП (схема), содержащих 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)фенильную группировку как по 3'-концевому рибозвену, так и по 5'-концевому фосфату олигонуклеотида (схема). В первом варианте (А) к синтезированному ОНП присоединяют алкилирующую группировку на заключительном этапе, в другом случае (Б) — сначала получают алкилирующее производное олигонуклеотида, которое затем вводят в реакцию с пептидом.

Согласно предложенной нами ранее методике [10], ОНП (II) синтезировали с выходом 74 %. Однако его окисление периодатом натрия с последующим удалением 5'-концевого уридина сопровождается побочной реакцией гидролиза фосфамидной связи в олигонуклеотидил-(3'-N)-пептиде с образованием р(Trp)<sub>9</sub>Trp. Поэтому выход (III) нестабилен и колеблется в пределах 40—60 %. Присоединение [4-(N-2-хлорэтил)-N-метиламинобензил] амина к 5'-фосфату ОНП осуществляли, как описано в работе [12]. Алкилирующее производное ОНП получено с выходом 53 %. Производное (IV) очищали при помощи ОФХ и анализировали гель-электрофорезом в 20 %-м полнакриламидном геле.

4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилиденное производное (VI) синтезировали согласно методике, описанной ранее [13]. Для исключения побочных реакций, связанных с гидролизом алкилирующего остатка, присоединение пептидов к IV проводили с большими предосторожностями. Хроматографию продуктов реакции вели при охлаждении (4 °С). Алкилирующие производные ОНП (VII)—(IX) анализировали с помощью ОФХ. Выходы соединений (VII)—(IX) составляли 50—60 %.

На наш взгляд, оптимальным вариантом получения алкилирующих производных ОНП является способ Б, который при меньшем количестве стадий позволяет синтезировать целевые продукты с удовлетворительными выходами.

Взаимодействие алкилирующего остатка с пептидным фрагментом ОНП при физиологических значениях рН среды, по-видимому, маловероятно ввиду того, что гуанидиновая группировка аргинина протонирована, а триптофан крайне трудно алкилируется. Подтверждением этому служат данные гель-электрофореза, исключающие присутствие димерных структур алкилирующих производных ОНП.

Ранее нами показано [8], что присоединение пептида к олигонуклеотиду с помощью спейсера (Ahx) практически не оказывает влияния на комплексообразующие свойства ОНП. Отсутствие аналогичного спейсера в структуре р(Trp)<sub>9</sub>Trp-3'-PrG-Arg-Val-OMe также не сказывается на термической устойчивости образуемого дуплекса. Температура плавления комплекса A<sub>16</sub> с олигонуклеотидил-(3'-N)-пептидом р(Trp)<sub>9</sub>Trp-3'-PrG-Arg-Val-OMe была 23,6 °С, тогда как A<sub>16</sub> с р(Trp)<sub>9</sub>Trp — 23,2 °С.

Таким образом, в данной работе впервые осуществлен синтез алкилирующих производных ОНП, сайт-специфические свойства которых

#### Протокол твердофазного синтеза Ahx-Trp-Trp-Trp-Gly-OMe

Операция	Объем, мл	Время, мин	Количество повторов
50 %-я TFA в DCM (1 %-й дитиотреитол)	25	2	1
50 %-я TFA в DCM (1 %-й дитиотреитол)	25	25	1
Промывка DCM	25	2	5
Промывка хлороформом	25	2	3
Промывка 10 %-м TEA в хлороформе	25	2	1
Промывка 10 %-м TEA в хлороформе	25	7	1
Промывка хлороформом	25	2	3
Промывка 50 %-м DMFA в DCM	25	2	1
Добавление 3-кратного избытка симметричного ангидрида <i>Woc</i> -аминокислоты в 50 %-м DMFA в DCM	20	360	1
Промывка 50 %-м DMFA в DCM	25	2	1
Добавление 1,5-кратного избытка симметричного ангидрида <i>Woc</i> -аминокислоты в 50 %-м DMFA в DCM	20	360	1
Промывка 50 %-м DMFA в DCM	25	2	2
Промывка Ac <sub>2</sub> O в DCM	25	2	1
Промывка Ac <sub>2</sub> O в DCM (1 %-й DMAP)	25	30	1
Промывка DCM	25	2	3

будут изучены в различных тест-системах. Результаты исследования эффективности проникновения в клетки алкилирующих производных ОНП и модификации ими биополимеров будут опубликованы отдельно.

**Summary.** Alkylating derivatives of oligonucleotidyl-(P-N)-peptides have been synthesized. These alkylating derivatives of oligonucleopeptides can be used as reagents for specific modification of nucleic acids.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shea Regan G., Marsters J. C., Bischofberger N.* Synthesis, hybridization properties and antiviral activity of lipid-oligodeoxynucleotide conjugates // *Nucl. Acids. Res.*—1990.—18, N 13.—P. 3777—3783.
2. *Leonetti J. P., Degols G., Milhaud P. et al.* Antiviral activity antisense oligonucleotides linked to poly (*L*-lysine): targets on genomic RNA and/or mRNA of vesicular stomatitis virus // *Nucleosides and Nucleotides.*—1989.—8, N 56.—P. 825—828.
3. *Абрамова Т. В., Власов В. В., Зарытова В. Ф. и др.* Влияние модификации концевых звеньев олигонуклеотидов на их стабильность в культуре клеток // *Молекуляр. биология.*—1991.—25, № 3.—С. 624—631.
4. *Чипенс Г. П., Полевая Л. К., Веретенникова Н. И., Крикис А. Ю.* Структура и функции низкомолекулярных пептидов.—Рига: Зинатне, 1980.—327 с.
5. *Герикович А. А., Кибирев В. К.* Синтез пептидов. Реагенты и методы.—Киев: Наук. думка, 1987.—254 с.
6. *Куликов С. В., Соколова Н. Ю., Леонова Е. Б., Самарцев М. А.* Присоединение трет-бутилоксикарбониламинокислот к хлорметилованному сополимеру стирола с дивинилбензолом в условиях межфазного катализа // *Биорг. химия.*—1989.—15, № 3.—С. 348—353
7. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Ярмолюк С. Н., Алексеева И. В.* Синтез олигонуклеотидил-(5'-N)-пептидов, содержащих аргинин // *Биополимеры и клетка.*—1989.—4, № 4.—С. 220—222.
8. *Ярмолюк С. М., Иванова Е. М., Кондратюк І. В. та ін.* Олігонуклеотиди. III. Синтез і вивчення аргиніновмісних олігонуклеотидил-(P-N)-пептидів // *Там же.*—1992.—8, № 6.—С. 95—100.
9. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П.* Синтез олигонуклеотидов в хлороформе триэфирным методом // *Биорг. химия.*—1983.—9, № 4.—С. 516—521.
10. *Ярмолюк С. М., Король Л. С., Алексеева І. В., Шаламай А. С.* Олігонуклеотиди. II. Синтез олігонуклеотидил-(P-N)-пептидів з допомогою окисно-відновного реагенту — трифенілфосфіну і 2,2'-дипіридилдисульфіді // *Биополимеры и клетка.*—1992.—8, № 5.—С. 16—20.
12. *Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.* Реакционноспособные фосфамиды моно- и динуклеотидов // *Биорг. химия.*—1986.—12, № 4.—С. 475—481.
13. *Райт А. К., Карпова Г. Г., Гринева Н. И.* Конформация 2',3'-O-[4-N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензильден]олигоцитидилатов и свойства их комплексов с полиинозиновой кислотой // *Биорг. химия.*—1977.—3, № 1.—С. 31—38.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев  
Ин-т биорг. химии СО РАН, Новосибирск

Получено 28.09.92

УДК 577.112.5

**Н. В. Латышко, Т. Л. Левитина,  
О. С. Мирошниченко, Л. В. Гудкова, Э. А. Козлов**

#### **ВЫДЕЛЕНИЕ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ПЕПТИДОВ, ОБРАЗОВАВШИХСЯ ПРИ РАСЩЕПЛЕНИИ КАТАЛАЗЫ ГРИБА *Penicillium vitale* СТАФИЛОКОККОВОЙ ПРОТЕИНАЗОЙ**

*Из гидролизата, полученного при расщеплении каталазы гриба *Penicillium vitale* стафилококковой протеиназой, методами гель-фильтрования, ионообменной хроматографии, высоковольтного электрофореза и хроматографии на бумаге выделены 38 пептидов и определен их аминокислотный состав и N-концевые остатки. 38 пептидов насчитывают в сумме 578 остатков аминокислот.*

**Введение.** Настоящее сообщение продолжает серию публикаций, посвященных исследованию первичной структуры каталазы *P. vitale*. Ранее были опубликованы работы по выяснению строения триптических пеп-

© Н. В. Латышко, Т. Л. Левитина, О. С. Мирошниченко, Л. В. Гудкова, Э. А. Козлов, 1993