

Современные методы синтеза олигонуклеотидопептидов[†]

Е.М.Зубин, Е.А.Романова, Т.С.Орецкая

*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова
119992 Москва, Ленинские горы, факс (095)939–3181*

Обсуждены литературные данные о методах химического синтеза олигонуклеотидопептидных конъюгатов в растворе и на твердой фазе. Проведена систематизация известных методов, отмечены их преимущества и недостатки. Работы, посвященные синтезу олигонуклеотидопептидов в растворе, систематизированы по типу химической связи между фрагментами, а работы по твердофазному синтезу олигонуклеотидопептидов — по способу получения конъюгатов (последовательным наращиванием олигонуклеотидной и пептидной цепей на одном полимерном носителе или твердофазной конденсацией двух заранее синтезированных фрагментов).
Библиография — 141 ссылка.

Оглавление

I. Введение	273
II. Синтез олигонуклеотидопептидов в растворе	274
III. Твердофазный синтез олигонуклеотидопептидов	290
IV. Заключение	299

I. Введение

Комплексы нукleinовых кислот с белками играют важную роль в процессах хранения и передачи генетической информации. К супрамолекулярным образованиям этого типа относят рибосомы, хроматин, вирусы, а также комплексы нукleinовых кислот с ферментами и регуляторными белками. Характерно, что стабильность таких структур поддерживается за счет различных видов нукleinово-белковых нековалентных взаимодействий.

Белко-нукleinовые комплексы, компоненты которых соединены между собой с помощью ковалентных связей, известны уже достаточно давно,^{1–3} причем они сразу же стали предметом детального исследования с целью установ-

ления их химического строения и выяснения функций, которые НК-белковые ковалентные структуры выполняют в клетке. При изучении свойств таких комплексов удобно использовать модельные нуклеотидопептиды.

Первые нуклеотидопептиды с фосфамидной, фосфодиэфирной, амидной и сложноэфирной связями между фрагментами были синтезированы сотрудниками химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова под руководством М.А.Прокофьева и З.А.Шабаровой.^{3,4} Ими же в конце 1960-х и начале 1970-х годов были получены первые олигонуклеотидопептиды — смешанные биополимеры, в состав которых входят олигонуклеотидный и пептидный компоненты.^{5,6} Однако в то время эти исследования не получили своего продолжения, в первую очередь из-за того, что еще не были четко сформулированы молекулярно-биологические задачи, для решения которых могли бы быть использованы олигонуклеотидопептиды.

Ситуация резко изменилась во второй половине 1980-х годов, когда для улучшения внутриклеточного транспорта антисмысловых олигонуклеотидов было предложено ковалентно присоединять к ним различные пептиды, обладающие способностью проникать через клеточную мембрану. Следует добавить, что интерес к олигонуклеотидопептидам возник на фоне значительного усовершенствования способов образования пептидной и межнуклеотидной связей, а также благодаря развитию твердофазного метода синтеза, который позволил в конечном итоге полностью автоматизировать процесс получения олигонуклеотидов и пептидов.

[†] Обзор посвящен памяти профессоров Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, выдающихся педагогов и ученых М.А.Прокофьева и З.А.Шабаровой, заложивших основы синтеза соединений, являющихся предметом данного обзора.

Дата поступления 13 декабря 2001 г.

За последние 10–15 лет было опубликовано достаточно большое количество работ по синтезу олигонуклеотидопептидов, и теперь возникла необходимость систематизировать существующие методы их синтеза. Ранние работы по синтезу олигонуклеотидопептидов были кратко рассмотрены в обзорах^{7–10}, опубликованных еще в начале 1990-х годов и посвященных более широкой теме — получению различных производных олигонуклеотидов.

Настоящий обзор содержит два основных раздела, в которых рассматривается синтез олигонуклеотидопептидов в растворе и на полимерных нерастворимых носителях. За рамками обзора остались методы получения конъюгатов олигонуклеотидов с аминокислотами и белками, так как каждая из этих групп методов является предметом самостоятельного обзора.

При обсуждении способов получения олигонуклеотидопептидов в растворе в качестве главного критерия, на основе которого осуществлялась систематизация литературных данных, был выбран тип химической связи между двумя компонентами молекулы, а при рассмотрении методов твердофазного синтеза — способ получения конъюгатов (последовательное наращивание олигонуклеотидной и пептидной цепей на одном полимерном носителе или твердофазная конденсация двух заранее синтезированных фрагментов).

Мы не рассматривали вопросы, касающиеся подтверждения строения промежуточных и целевых соединений, так как в абсолютном большинстве работ осуществлен корректный анализ с использованием современных физико-химических методов, а также методы выделения олигонуклеотидов и олигонуклеотидопептидов, если они стандартны. Мы также не рассматривали возможности и перспективы применения олигонуклеотидопептидов в антисмысловой биотехнологии, так как этим вопросам посвящены обзоры, опубликованные в 2000 г. Гейтом и сотр.,¹¹ а также Тангом и Стейном.¹² В последней работе есть подраздел, посвященный методам синтеза олигонуклеотидопептидных конъюгатов, однако он написан в очень сжатой форме без подробного обсуждения химических реакций, лежащих в основе получения гибридных молекул.

Такое ограничение круга рассматриваемых вопросов позволило нам сосредоточить внимание прежде всего на обсуждении различных подходов к синтезу олигонуклеотидопептидов и на методах образования ковалентной связи в конъюгатах между олигонуклеотидным и пептидным фрагментами, а также подробно проанализировать те проблемы, которые в ряде случаев возникают при получении таких структур.

Принципы, лежащие в основе классификации и номенклатуры олигонуклеотидопептидов, еще до конца не определены. В настоящее время существует несколько способов наименования конъюгатов олигонуклеотидов с пептидами. Ряд авторов предлагает рассматривать эти соединения как производные пептидов с олигонуклеотидным заместителем в боковой цепи. Исходя из этого, соединения, состоящие из остатков аминокислот (пептидов) и нуклеозидов (нуклеотидов), предложено называть нуклеоаминокислотами или нуклеопептидами.¹³ При сокращенной записи обозначение олигонуклеотида помещают в скобках непосредственно после символа соответствующей аминокислоты, например, H-Ala-Ser(pATAT)-Ala-OH. Данный подход часто применяется при составлении названий конъюгатов, в которых пептид соединен с олигонуклеотидом посредством фосфодиэфирной связи так, что в ее образовании принимают участие OH-группа остатка одной из гидроксиаминокислот и концевой фосфат олигонуклеотида.

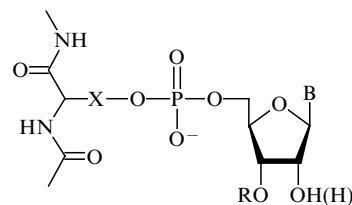
З.А.Шабаровой при создании номенклатуры данного класса смешанных биополимеров был использован другой подход.⁴ Все соединения, в состав которых входят аминокислотный (пептидный) и нуклеотидный (олигонуклеотидный) компоненты, были названы нуклеотидопептидами. Название конкретного соединения складывается из двух частей — названия остатка нуклеотида и названия аминокислоты (пептида). Эти названия разделяются скобками, в которых указывается характер связи между ними. Так, соединение, в котором остаток фенилаланина присоединен к 5'-фосфату уриду в с помощью фосфамидной связи, будет называться уридилил-(5' → N)-фенилаланином. Такая номенклатура активно применяется для нуклеотидопептидов с фосфодиэфирной или фосфамидной связью между фрагментами.

Основные трудности возникают при составлении названий конъюгатов, в которых олигонуклеотидную и пептидную части молекулы связывает специальное мостиковое звено, имеющее достаточно сложное строение. В данном случае соединение фактически состоит из трех фрагментов. Авторы абсолютного большинства опубликованных работ предпочли использовать для таких соединений некие общие названия. В зарубежной литературе наибольшее распространение получил термин «конъюгаты, или гибриды олигонуклеотидов с пептидами» (peptide-oligonucleotide conjugates (hybrids)). Авторы немногочисленных публикаций на русском языке употребляют такие термины, как «пептидилолигонуклеотиды», «пептидилпроизводные олигонуклеотидов» или «пептид-олигонуклеотидные конъюгаты». По нашему мнению, эти названия являются не вполне удачными. По аналогии с понятием «нуклеотидопептиды» (nucleotide-peptides) и в соответствии с рекомендациями, данными профессором Шабаровой, мы предлагаем использовать в качестве основного названия конъюгатов олигонуклеотидов с пептидами термин «олигонуклеотидопептиды» (oligonucleotide-peptides).

II. Синтез олигонуклеотидопептидов в растворе

1. Конъюгаты с фосфодиэфирной связью между фрагментами

Результаты исследований ковалентных комплексов, выделенных из адено-вирусов, полиовирусов и некоторых бактериофагов,^{2,3} показали, что в этих соединениях белок связывается с нукleinовой кислотой с помощью фосфодиэфирной связи, в образовании которой принимают участие HO-группа остатка одной из гидроксиаминокислот и 5'-концевой фосфат полинуклеотида.

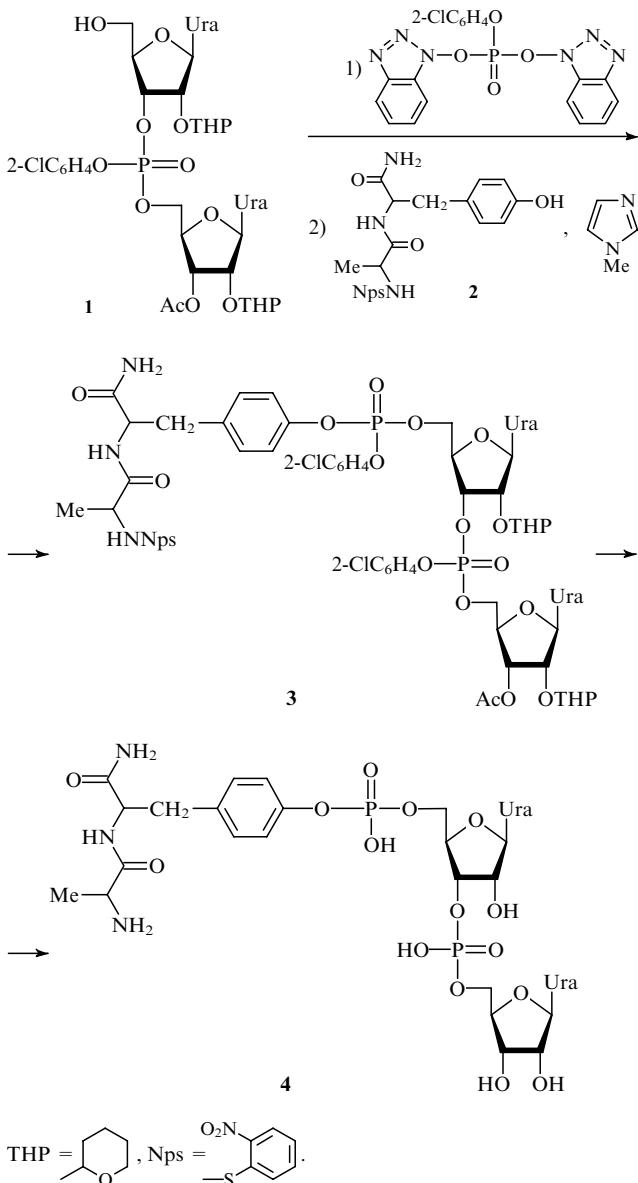


X = –CH₂–, –CH₂CH₂–, –CH(CH₃)–, –CH₂C₆H₄–;
R — полинуклеотидная цепь;
B — здесь и далее гетероциклическое основание.

Установлено, что превращения ДНК под действием топоизомеразы I протекают через образование ДНК-белковой структуры. В ней белок ковалентно присоединен к месту разрыва одной из цепей двойной спирали через остаток тирозина.¹⁴

Для упрощения изучения сложных НК-белковых структур представляется целесообразным использовать модельные соединения, например олигонуклеотидопептиды фосфодиэфирного типа. В этой связи основное внимание уделяется разработке эффективных методов получения этих соединений. Так, ван Бум и сотр.¹⁵ предложили использовать фосфорилирование гидроксильной функции пептида 5'-фосфатом олигонуклеотида. В качестве ключевых соединений авторы работы¹⁵ использовали частично защищенный динуклеозидфосфат **1** и амид *N*-блокированного дипептида Nps-Ala-Tyr-NH₂ (**2**) (схема 1).

Схема 1

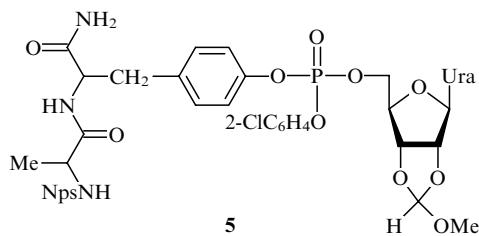


оптимальный вариант активации фосфатного остатка и находить подходящие способы блокирования всех функциональных групп пептида и олигонуклеотида, не подлежащих фосфорилированию и не участвующих в конденсации. Важно отметить, что условия удаления защитных группировок должны быть достаточно мягкими, чтобы предотвратить протекание побочных процессов.

Для фосфорилирования и одновременной активации динуклеозидфосфата **1** применяли бисбензотриазолид 2-хлорфенилфосфата в пиридине. К образовавшемуся активированному производному добавляли дипептид **2** в присутствии *N*-метилимидазола и получали полностью защищенный олигонуклеотидопептид **3** с 80%-ным выходом. Последний выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Крайне важным представляется то обстоятельство, что конденсация олигонуклеотидного и пептидного компонентов приводит к образованию между ними связи фосфотриэфирного типа. Авторы описывают также альтернативный путь получения соединения **3**. В этом случае сначала на гидроксильную группу тирозина в составе пептида действуют бифункциональным фосфорилирующим агентом, а затем к реакционной смеси прибавляют динуклеозидфосфат **1**. Выход олигонуклеотидопептида **3**, полученного этим путем, составил 78%.

Для деблокирования функциональных групп в соединении **3** использовали следующую последовательность операций.¹⁵ Вначале удаляли обе 2-хлорфенильные фосфат-блокирующие группы действием оксимат-иона. Основная трудность в удалении этих защит связана с наличием в одном из триэфиров фосфорной кислоты еще одной арилоксигруппы, образованной с участием боковой цепи остатка тирозина. В связи с тем, что в данном случае уходящие группы имеют близкие значения pK_a с остающейся арилоксигруппой, авторы не были уверены в возможности селективного отщепления 2-хлорфенильной группировки под действием *cis*-4-нитробензальдоксина и *N*¹,*N*¹,*N*³,*N*³-тетраметилгуанидина.

Чтобы проверить, можно ли избирательно удалить 2-хлорфенильную защиту, авторы синтезировали модельное соединение **5**.



При его деблокировании среди продуктов реакции дипептид **2** обнаружен не был. Строение H-Ala-Tyr(pU)-NH₂ было подтверждено данными спектроскопии ЯМР ³¹P. Обобщая все эти факты, авторы работы¹⁵ сделали вывод о возможности селективного удаления 2-хлорфенильной фосфат-блокирующей группы с помощью *cis*-4-нитробензальдоксина и *N*¹,*N*¹,*N*³,*N*³-тетраметилгуанидина.

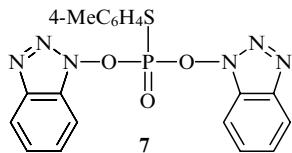
Для удаления 3'-O-ацетильной группы соединение **3** обрабатывали триэтиламином в смеси метанол – вода. 2-Нитрофенилсульфенильную (Nps) и 2'-O-тетрагидропиранильную (THP) группировки отщепляли при комнатной температуре действием хлористого водорода в метаноле в течение 3 ч и водного раствора HCl (pH 2) в течение 14 ч.

Естественным продолжением работы¹⁵ можно считать работу голландских исследователей,¹⁶ предпринявших попытку разработать надежный метод синтеза олигонуклеотидопептидов фосфодиэфирного типа, в которых фрагмент

В основе другого метода синтеза олигонуклеотидопептидов фосфодиэфирного типа лежит взаимодействие *O*-фосфорилированного пептида и олигонуклеотида со свободной 5'-гидроксильной группой. В обоих случаях исследователям приходилось решать по крайней мере две задачи: выбирать

ДНК связан с пептидом через сериновый или треониновый остаток. Дело в том, что получение таких олигонуклеотидопептидов осложняется высокой лабильностью фосфодиэфирной связи. Это обстоятельство может существенно затруднить процесс деблокирования функциональных групп и ограничить выбор применяемых для этого реагентов.

Анализ литературных данных^{3,4} позволяет сделать вывод, что устойчивость и механизм расщепления фосфоди-эфирной связи в олигонуклеотидил-(5' → O)-пептидах зависят от природы аминокислоты, содержащей гидроксигруппу. Это обусловлено различными механизмами расщепления фосфодиэфирной связи. Если в ее образовании участвует остаток тирозина, то она устойчива в умеренно кислой и щелочной средах, а в жестких щелочных условиях расщепляется так же, как связь в обычных дизифирах фосфорной кислоты. Если же в образовании фосфодиэфирной связи принимает участие остаток серина или треонина, то в щелочной среде протекает β-эlimинирование фосфомонозифирной группы (олигонуклеотида с 5'-концевым фосфатом). В случае серина пептидный фрагмент, образующийся в результате этой реакции, содержит остаток дегидроаланина (схема 2).



Выход соединения **6a** составил 80%. Соединение **6b** было получено с относительно невысоким выходом (50%). Авторы отмечают, что это может быть связано с низкой растворимостью дипептида Nps-Ala-Thr-NH₂ в смеси диоксан – пиридин.

Для снятия Mps-группы полностью блокированный олигонуклеотидопептид **6a** обрабатывали избытком ацетата серебра в смеси пиридин–вода. Полное отщепление Mps-группы происходило при комнатной температуре за 48 ч. Однако деблокирование межнуклеотидного фосфата оксимат-ионом привело к разрыву фосфодиэфирной связи между частями гибридной молекулы **6a** по механизму β -элиминирования (данные спектроскопии ЯМР ^{31}P). В то же время при удалении фосфат-блокирующих групп в соединении **6b** теми же реагентами фосфодиэфирная связь оставалась стабильной. Более мягким агентом для отщепления 2-хлорфенильной защиты оказался фторид тетрабутиламмония. Удаление Nps- и THP-групп осуществляли 0,01 М HCl (рН 2, 0–5°C, 16 ч).

Авторы работы¹⁶ исследовали устойчивость полученных ими олигонуклеотидопептидов H-Ala-Ser(pTT)-NH₂ и H-Ala-Thr(pTT)-NH₂ в щелочной среде. При анализе этих соединений методом спектроскопии ЯМР ³¹P установлено, что под действием 0.15 M NaOH (20°C) H-Ala-Ser(pTT)-NH₂ полностью гидролизуется за 25 мин с образованием динуклеотида pTT, в то время как H-Ala-Thr(pTT)-NH₂ в тех же условиях даже после 9-часовой обработки щелочью расщепляется не полностью.

В дальнейшем та же группа исследователей применила предложенный ими подход для синтеза конъюгатов с гетероолигонуклеотидным компонентом.^{17,18} Сложность синтеза подобных соединений заключается в необходимости блокирования эндоциклических аминогрупп гетероциклических оснований. Авторы отказались от традиционно используемых в олигонуклеотидном синтезе ацильных защитных группировок, так как их удаление под действием концентрированного аммиака сопровождается разрывом фосфодиэфирной связи между олигонуклеотидом и пептидом, если в ее образовании участвует гидроксильная группа серина или треонина. При этом может происходить также катализируемая основаниями рацемизация при α -углеродном атоме аминокислотных остатков. Поэтому при синтезе олигонуклеотидопептидов использовали защитные группировки, обычно применяемые в пептидном синтезе.

Ван Бум и сотр.¹⁵ осуществляли блокирование NH₂-групп аденина и цитозина с помощью Nps-группировки. Она сравнительно легко вводится, устойчива в условиях фосфорилирования и увеличивает стабильность N-гликозидной связи пуриновых нуклеозидов в кислой среде. Однако попытка авторов работы ¹⁸ получить N²-нитрофенилсульфенилдезоксигуанозин оказалась неудачной. Поэтому для блокирования экзоциклической NH₂-группы гуанина они использовали N,N-ди-n-бутилформамидиновую защиту ($-\text{N}=\text{CHNBu}_2^n$, DNB), которая стабильна в условиях колоночной хроматографии на силикагеле и удаляется при мягкой обработке гидразином. Следует отметить, что если в ранних работах^{15,16} для синтеза олигонуклеотидопептидов в качестве исходных компонентов использовали только амиды N-блокированных пептидов, то позже голландские исследователи^{17,18} решили применить также пептиды, блокированные

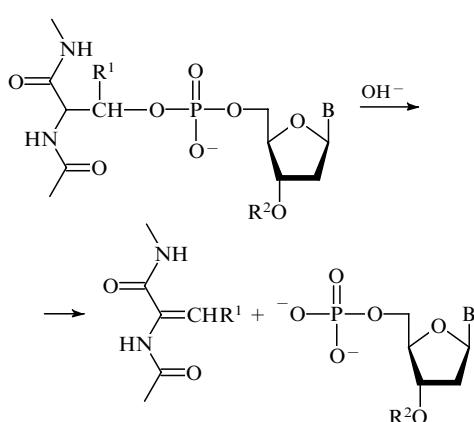
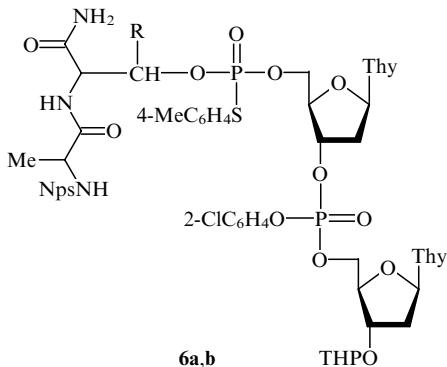


Схема 2

$R^1 = H, Me$; R^2 — полинуклеотидная цепь.

Существует различие в гидролитической устойчивости серинового и треонинового производных:³ последнее более стабильно к щелочной обработке.

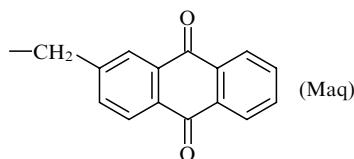
Для получения конъюгатов **6a,b**



R = H (a), Me (b)

была использована методика, аналогичная рассмотренной выше. В качестве фосфорилирующего агента авторы работы¹⁶ применили бисбензотриазолид *S*-(*n*-толил)тиофосфата (7), так как *n*-толилсульфенильная (Mps) группа отщепляется в мягких условиях.

по концевой карбоксильной функции аллильной (All)¹⁷ или антрахинон-2-илметильной (Maq) группами.¹⁸

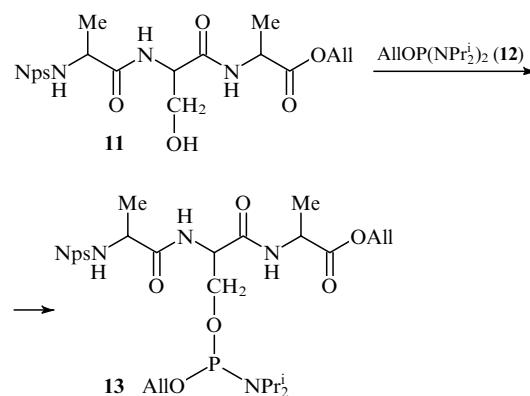


Подходы к синтезу олигонуклеотидопептидов H-Phe-Tyr(pATAT)-NH₂, H-Phe-Tyr(pGC)-NH₂ и H-Phe-Ser(pGC)-Ala-OH (см. работы^{17,18}) в целом аналогичны тем, которые были предложены в ранних работах^{15,16}, однако процедуры деблокирования промежуточно образующихся полностью защищенных олигонуклеотидопептидов **8–10** претерпели изменения: Nps-защита удалялась 2-меркаптопиридином, а 3'-левулинильная (Lev) и DNB-защиты — гидразингидратом.

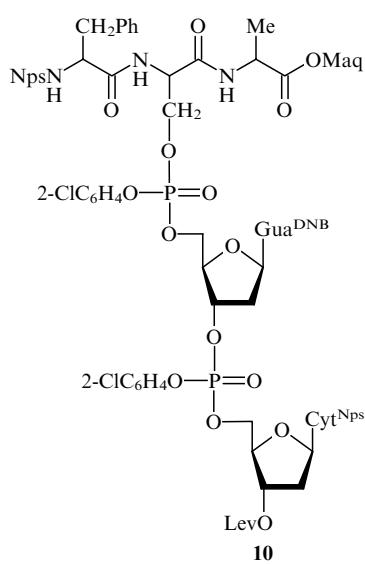
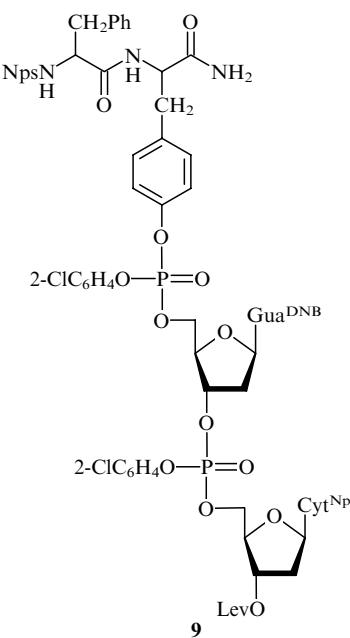
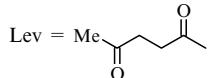
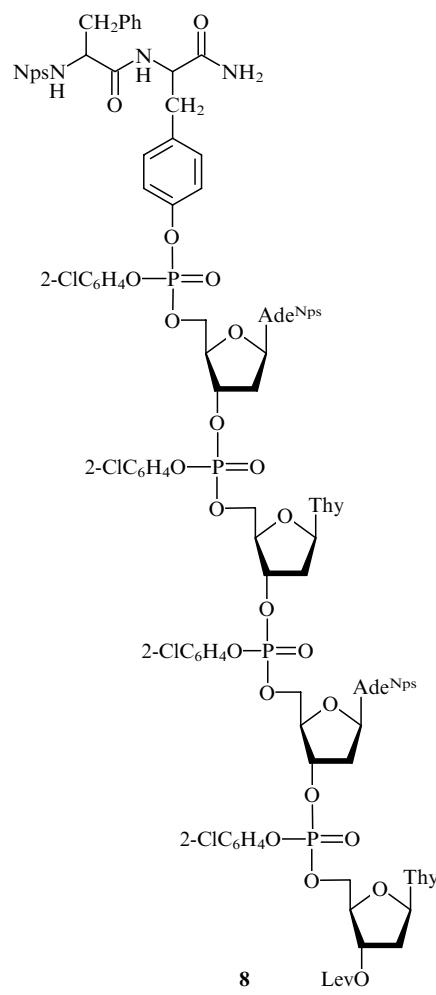
Для получения H-Ala-Ser(pATAT)-Ala-OAll авторы работы¹⁷ первоначально применили фосфотриэфирный метод. Выход полностью блокированного олигонуклеотидопептида составил 64%. Удаление защитных групп проводили тем же способом, что и в случае соединения **8**. Альтернативный вариант, который заключался в фосфорилировании трипептида Nps-Ala-Ser-Ala-OAll бисбензотриазолидом 2-хлорфенилфосфата и последующей реакции активированного производного трипептида с частично защищенным тетramerом ATAT, оказался неудачным. При фосфорилиро-

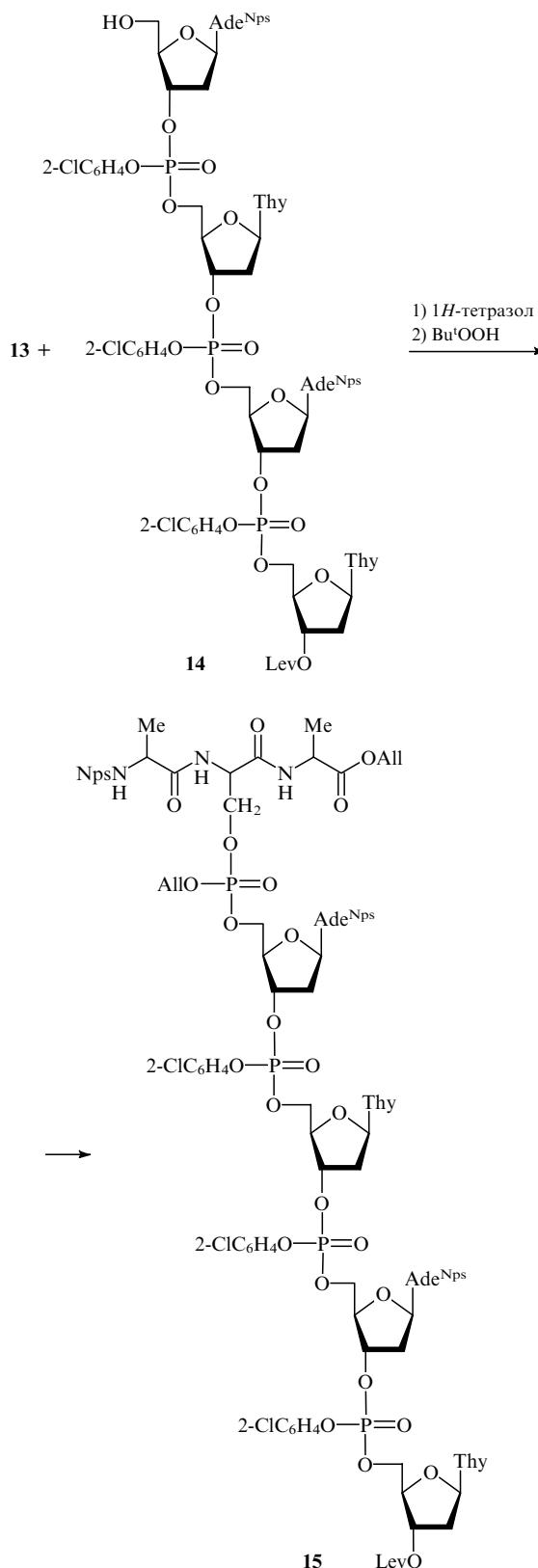
вании гидроксильной группы серина наблюдали образование нежелательного симметричного продукта.

Авторы работы¹⁷ сумели избежать этих трудностей, когда применили амидофосфитный метод.



Сначала трипептид **11** обрабатывали в течение 30 мин эквимолярными количествами 1*H*-тетразола и фосфитилирующего агента **12** в ацетонитриле, а затем к образовавшемуся фосфиту **13** добавляли эквимолярное количество тетрамера **14** и 1*H*-тетразол. Продолжительность реакции составляла 18 ч. Фосфитную связь в образовавшемся конюгате окисляли до фосфатной действием *tert*-бутилгидропероксида.



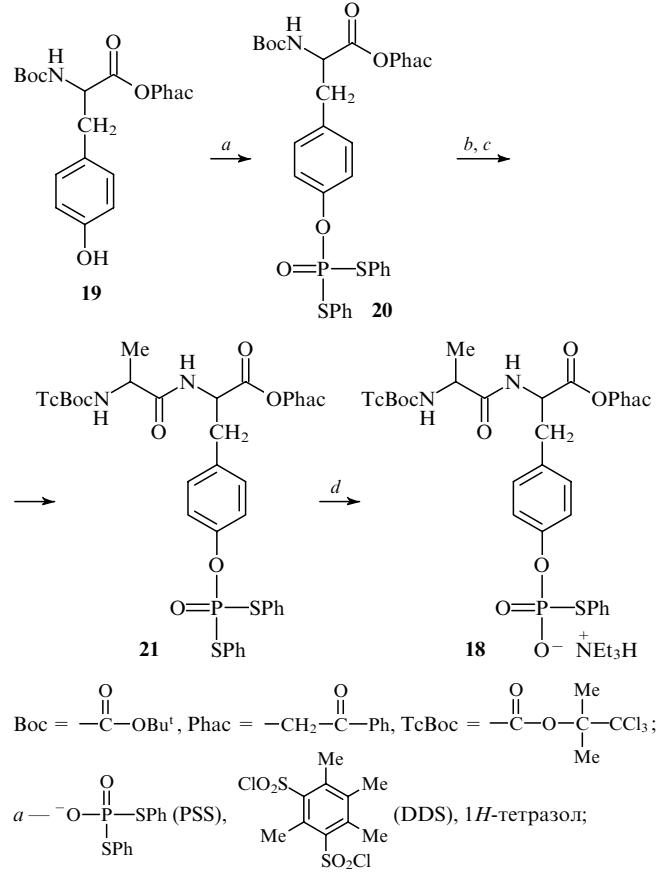


H-Ala-Ser(pATAT)-Ala-OAll, по мнению авторов публикации¹⁷, является то, что не удалось деблокировать карбоксильную группу С-концевого аминокислотного остатка с использованием комплексов переходных металлов.

Особый интерес представляют публикации^{19,20} японских ученых, предложивших оригинальный метод синтеза олигонуклеотидопептидов фосфодиэфирного типа H-Ala-Tyr(pUU)-OH (16) и H-Ala-Ser(pTT)-Phe-OH (17), в основе которого лежит химия тиофосфатов.

В работе¹⁹ фосфорилированный дипептидный компонент 18 получали с использованием Вос-стратегии по схеме 3.

Схема 3

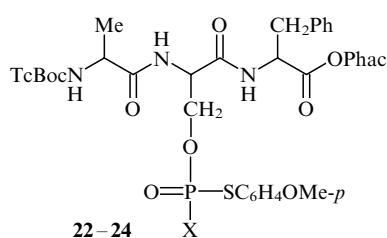


На первом этапе частично блокированное производное тирозина **19** фосфорилировали с помощью *S,S*-дифенилдитиофосфата (PSS) в присутствии изодуродисульфохлорида (DDS). К образовавшемуся фосфорилированному производному тирозина **20** после деблокирования аминогруппы добавляли частично защищенный аланин. В качестве конденсирующего агента при образовании пептидных связей применяли *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (DCC) в присутствии 1-гидроксибензотриазола (НОБТ). Избирательное отщепление одной фенилтиогруппы в производном **21** проводили, действуя раствором триэтиламмониевой соли фосфорноватистой кислоты в пиридине.¹⁹

Аналогичным образом получали фосфорилированный трипептид **22**.²⁰ В этом случае гидроксильную функцию

Большим преимуществом данного метода является использование алильной защиты в составе фосфотриэфирного мостика между трипептидом и олигонуклеотидом в полностью защищенном олигонуклеотидопептиде **15**, которая легко удаляется в смеси пиридин – вода. Единственным недостатком фосфотриэфирной и фосфитной схем синтеза

серина фосфорилировали с помощью *S,S*-ди-(*n*-метоксифенил)дитиофосфата (MPSS).



$\text{X} = \text{SC}_6\text{H}_4\text{OMe}-p$ (22), $\text{O}^- \text{ HNEt}_3$ (23), OSnBu_3^n (24).

Однако при обработке соединения 22 раствором триэтиламмониевой соли фосфорноватистой кислоты в пиридине наблюдали образование MPSS, а не соединения 23.²⁰ Вероятно, это явилось результатом β -элиминирования дитиофосфата. Поэтому для селективного удаления одной *n*-метоксифенилтиогруппы использовали более мягкую

обработку бис(трибутилолово)оксидом, в результате которой получали соединение 24.

Синтез частично защищенных динуклеотидных компонентов 25 и 26 (схемы 4 и 5) также связан с использованием PSS и DDS как бифункционального конденсирующего агента. N^3 -TcBoc-Группа урацила и тимины может быть удалена в нейтральных условиях восстановлением цинком в ацетилацетоне.

Для того чтобы синтезировать требуемый олигонуклеотидопептид 16, исходные соединения 18 и 25 вводили в реакцию с DDS и 3-нитро-1,2,4-триазолом (схема 4). Полностью защищенный олигонуклеотидопептид 27 был получен с выходом 73%.¹⁹

Использование тех же реагентов при синтезе олигонуклеотидопептида 17 (схема 5) приводит к образованию как требуемого соединения 17, так и трипептида, содержащего остаток дегидроаланина. Поэтому реакцию вели в присутствии избытков *N*-метилимидазола и триизопропилфенилсульфохлорида (TPSCl).²⁰ Последовательное деблокирование соединений 27 и 28 привело в результате к конъюга-

Схема 4

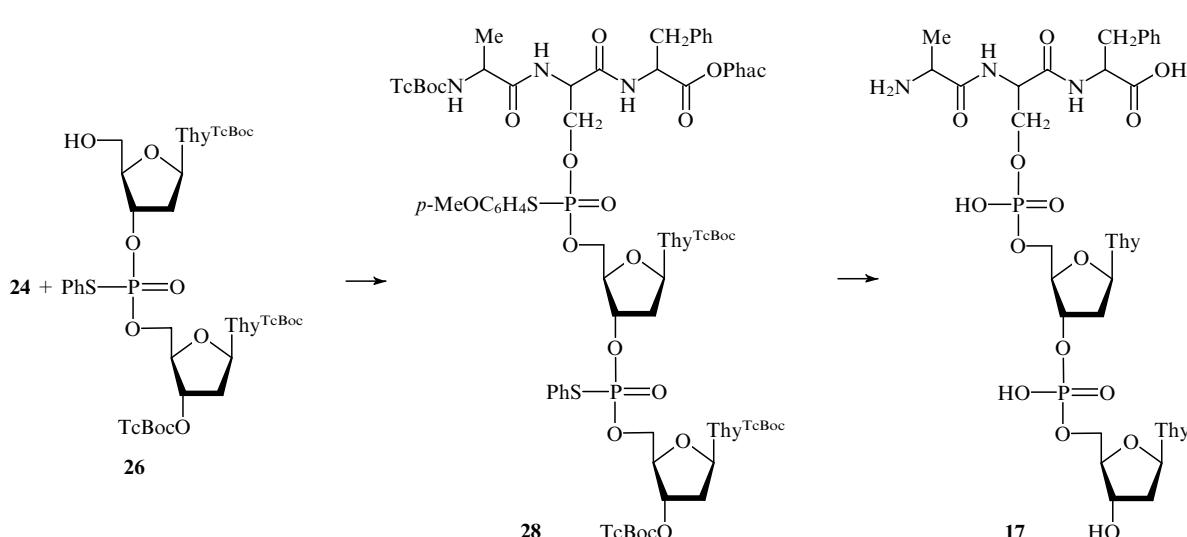
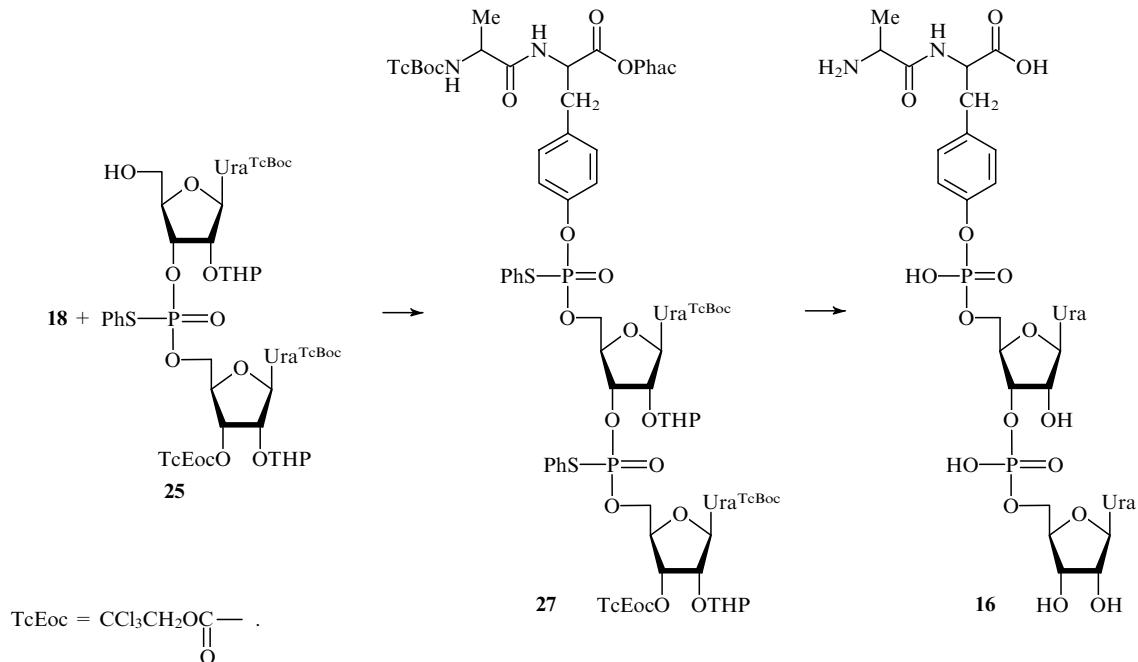


Схема 5

там 16 и 17 соответственно. Фосфатные группы деблокировали под действием избытка $(Bu_3^N\text{Sn})_2O$. Группы TcBoc, Phac и TcEoc отщепляли восстановлением цинком в ацетилацетоне. $2'-O$ -Тетрагидропиранильные группы в соединении 27 удаляли стандартным способом (0.01 М HCl, pH 2).

2. Коньюгаты с фосфамидной связью между фрагментами

Исторически первыми были синтезированы смешанные биополимеры, в которых олигонуклеотидная часть присоединялась к пептидной за счет фосфамидной связи. На примере динуклеозидфосфатов Прокофьев, Шабарова и сотр.^{5,21} продемонстрировали возможность модификации межнуклеотидной фосфатной группы (схема 6).

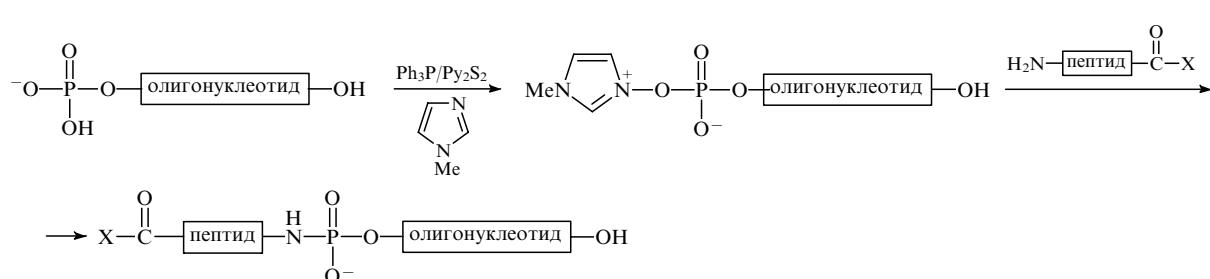
можно вводить в реакцию с нуклеофилом без предварительного выделения. Выход конечного продукта **31** составляет 75%. Однако описанный метод⁵ давал хорошие результаты только в случае дезоксирибопроизводных, при наличии же защищенной 2'-гидроксильной группы рассматриваемое превращение протекало всего на 10%.

Другой подход к синтезу олигонуклеотидопептидов фосфамидного типа был предложен новосибирскими исследователями.²²⁻²⁵ В этом случае α -аминогруппа пептида реагирует с предварительно активированным 3'- или 5'-концевым фосфатом олигонуклеотида. Достоинством данного метода является возможность использования незащищенных фрагментов нуклеиновых кислот. Это связано с тем, что селективную активацию фосфатного остатка проводят смесью трифенилfosфина и 2,2'-дипиридилидисульфида в присутствии нуклеофильного катализатора *N*-метилимидазола (схема 7). В этих условиях межнуклеотидные фосфатные группы и реакционноспособные центры гетероциклических оснований не затрагиваются. Механизм такой активации моноэфиров фосфорной кислоты детально рассмотрен в обзоре Зарытовой.²⁶

В работах^{22, 23} 5'-концевую фосфатную группу активировали в смеси диметилформамида и диметилсульфоксида. При этом олигонуклеотиды переводили в органические растворители в виде соответствующих цетилтриметиламмониевых (цетавлоновых) солей. В процессе активации фосфатного остатка олигонуклеотида образуется *N*-метилимидазолид олигонуклеотида, реагирующий с аминами, р_{Ka} которых находится в широком интервале, причем с ростом р_{Ka} скорость образования фосфамидной связи увеличивается. В пептидах H-Pro-Arg-Val-OMe и H-(Leu-Arg)_n-Gly-NH₂ (*n* = 2–4) наиболее основный характер имеет гуанидиновая группировка аргинина. Чтобы последняя не вступала во взаимодействие с активированным фосфатом олигонуклеотида, пептиды вводят в реакцию в виде трифторацетатных солей. В этих условиях гуанидиновая функция все время остается протонированной, и основным нуклеофильным центром после избирательного депротонирования под действием триэтиламина будет α -аминогруппа пептида.

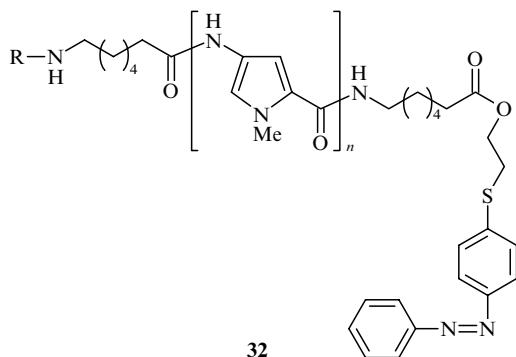
Наличие связи Р—N в полученных олигонуклеотидопептидах подтверждено с помощью спектроскопии ЯМР ^{31}P и кислотного гидролиза в условиях расщепления фосфамидной связи (0.1 М HCl, 18 ч). Целевые олигонуклеотидопептиды выделяли при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ; их выходы составляли 70–85%. Авторы работы²³ отмечают, что присоединение пептида к олигонуклеотиду увеличивает гидрофобность последнего. При анализе методом обращенно-фазовой ВЭЖХ время удерживания продукта реакции увеличивается по сравнению со временем удерживания исходного олигонуклеотида.

Описанный выше метод был применен для конъюгации синтетического аналога пептидного антибиотика нетропсина (Nt) с олиготимидиловой и олигодезоксиадениловой



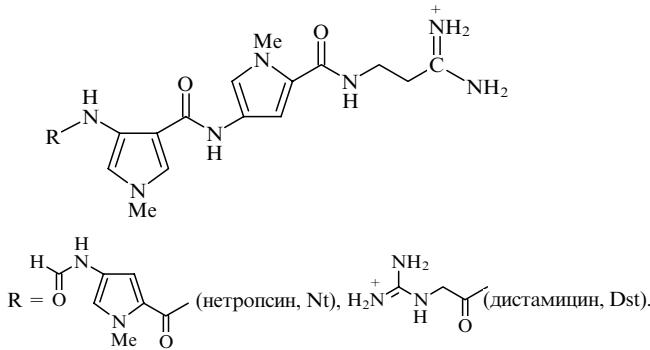
$X = \text{OMe}, \text{NH}_2$.

кислотами.²⁴ В этом случае пептид присоединяли к 3'-концу олигонуклеотида. Выходы конъюгатов **32** составили 30–50%.

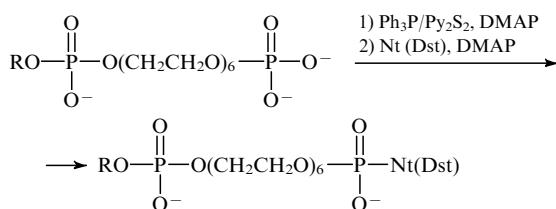


$n = 2-5$; R — фрагмент олигонуклеотидной цепи.

Несколько отличный подход предложен для получения ковалентных комплексов немодифицированных олигонуклеотидов, а также их тиофосфатных аналогов с нетропсином или другим пептидным антибиотиком — дистамицином (Dst).²⁵

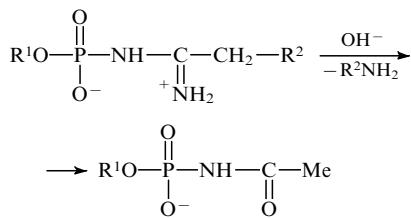


В условиях автоматического амидофосфитного дезоксирибонуклеотидного синтеза получали олигонуклеотиды, содержащие гексаэтиленгликоловый линкер с фосфатной группой на 3'- или 5'-конце. После этого активировали концевую фосфатную группу реагентами окислительно-восстановительного типа Ph_3P и Py_2S_2 в присутствии 4-диметиламинопиридинина (DMAP) и добавляли к активированному олигонуклеотиду пептидный антибиотик (Nt или Dst) и избыток DMAP. Последний необходим, по мнению авторов работы²⁵, для нейтрализации положительных зарядов аминовой и гуанидиновой группировок.



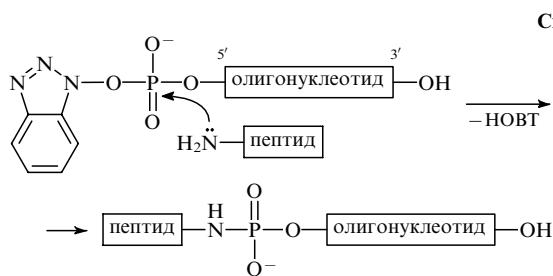
R — фрагмент олигонуклеотидной цепи.

Авторы предполагают,²⁵ что между антибиотиком и фрагментом РНК формируется ковалентная связь Р—N, в образовании которой участвует аминовая функция антибиотика. Косвенно этот факт подтверждается тем, что скорости гидролиза олигонуклеотидных производных нетропсина и ацетамицина под действием концентрированного водного раствора аммиака одинаковы. По-видимому, в процессе гидролиза происходит дезаминирование:



R¹ — фрагмент олигонуклеотидной цепи, R² — остаток антибиотика.

Московской исследовательской школой, возглавляемой З.А.Шабаровой,²⁷ предложен метод индуцируемой карбодиимидом 1-гидроксибензотриазольной активации концевых фосфатных групп олигонуклеотидов. НОВТ-Эфиры достаточно устойчивы в водной среде и могут эффективно фосфорилировать нуклеофильные агенты с образованием ковалентной связи (схема 8). В качестве таких нуклеофильных агентов могут выступать аминокислоты и пептиды.



Так, в работе²⁸ описан синтез конъюгата Gly-Gly-(5' → N)-(pTCTAG), а в работе²⁹ — производных олигодезоксирибонуклеотидов, в которых к 5'-концевой фосфатной группе присоединен остаток антибиотика — полимиксина B1, представляющего собой поликатионный пептид. Выходы продуктов достигали 80%. Авторами работы²⁹ сконструирован и успешно получен конъюгат ундекануклеотида, в котором к 3'-концевому фосфату присоединен остаток антибиотика дауномицина, а к 5'-концевому — остаток полимиксина B1 (для улучшения проникновения олигонуклеотида через клеточную мембрану). Этот конъюгат выделяли электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ); суммарный выход его составил 20%.

Естественным продолжением работ^{27–29} стало перенесение предложенных в них методик на производные РНК.³⁰ Были подобраны условия эффективного получения НОВТ-эфиров 5'-олигорибонуклеотидов. На примере синтетического РНК-дуплекса, содержащего участок связывания белка Tat ВИЧ-1, показано образование специфического комплекса этого дуплекса с пептидом Tat. Ковалентное связывание активированного дуплекса РНК с пептидом протекает с эффективностью 20–30% и не требует внешней активации. Таким образом, комплекс пептид Tat — дуплекс TAR РНК является примером эффективного ковалентного связывания белка с РНК в составе специфического комплекса.

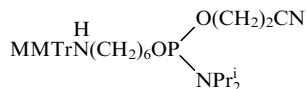
Недавно описан синтез конъюгата триплексобразующего олигонуклеотида с функционально значимым пептидом. Такой конъюгат является удобным инструментом в работах по модуляции генной экспрессии.^{31,32}

3. Конъюгаты с амидной связью между фрагментами

Работы^{33–40} посвящены синтезу конъюгатов, в которых олигонуклеотидный и пептидный фрагменты соединены амидной связью, образующейся в результате взаимодействия активированной α -карбоксильной группы пептида с али-

фатической NH_2 -группой, предварительно введенной в состав олигонуклеотида.

Алифатическую аминогруппу, как правило, присоединяют к 5'- или 3'-концу олигонуклеотидов через полиметиленовый спейсер в процессе автоматического амидофосфитного синтеза. Для получения фрагментов ДНК с 5'-концевой NH_2 -группой удобным реагентом является коммерчески доступный (6-аминогексил)(2-цианэтил)- N,N -дизопропиламинофосфит, аминогруппа которого блокирована 4-моно-метокситритильной (MMTr) защитной группой.



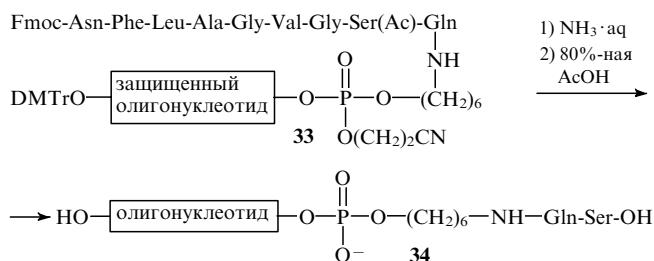
Синтез олигонуклеотидов, содержащих 3'-аминоалкильную группу, осуществляют с использованием специального УФ-расщепляемого полимерного носителя с фотолабильной якорной группировкой, содержащей на конце аминогексанольную функцию (схема 9). Присоединение к нему первого нуклеотидного звена проводят в автоматическом ДНК-синтезаторе, а отщепление от носителя уже готового олигонуклеотида с 3'-концевой аминогруппой происходит при УФ-облучении.⁴¹ Основное достоинство данного метода состоит в том, что использование фотолабильной якорной группировки позволяет синтезировать блокированные олигонуклеотиды, в составе которых свободной является только алифатическая аминогруппа.

В работе³³ такой частично защищенный олигонуклеотид вводили в конденсацию с одним из двух N -блокированных трипептидов — Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH (Fmoc — 9-флуоренилметоксикарбонильная защитная группа) или Fmoc-Gly-Gly-His-OH (см. схему 9). Активацию карбоксильных групп в трипептидах осуществляли с использованием смеси Ph_3P и Py_2S_2 в присутствии 4-диметиламинопиридина. Реакцию вели в диметилформамиде при комнатной температуре из-за опасения, что в более жестких условиях может происходить отщепление Fmoc-группы, сопровождающееся олигомеризацией трипептида. Выход олигонуклеотидопептидов после деблокирования и выделения с помощью ионообменной ВЭЖХ или электрофореза в ПААГ составил 89–99%.

Американские исследователи⁴² отмечают, что при конденсации коротких пептидов и олигонуклеотидов с исполь-

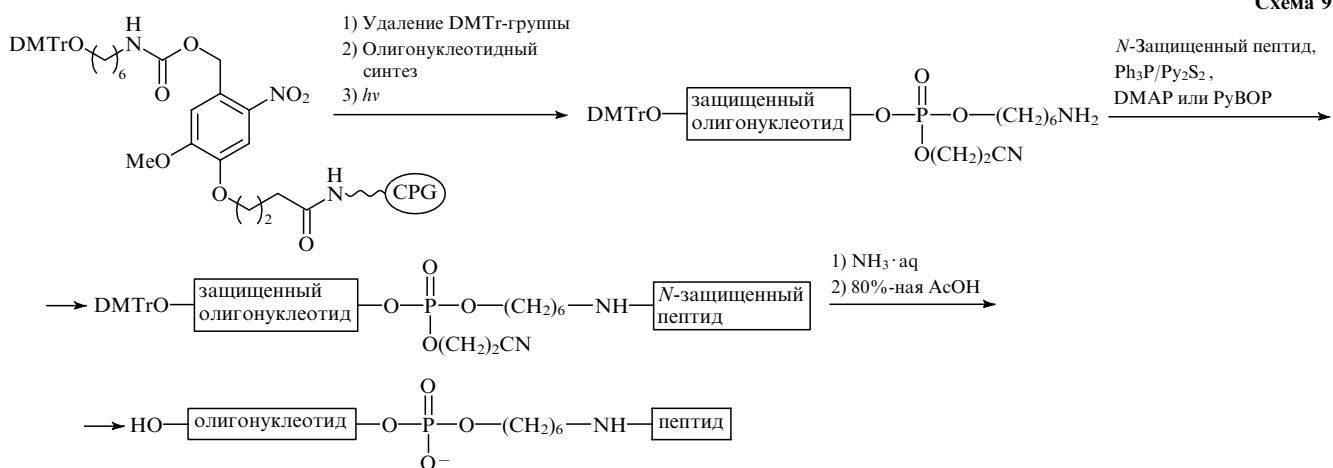
зованием реагентов окислительно-восстановительного типа происходит эпимеризация при α -углеродном атоме в С-концевом аминокислотном остатке. Модельный эксперимент продемонстрировал, что степень эпимеризации в этих условиях достигает 30% (данные спектроскопии ЯМР ^1H).

В работе³⁴ была предпринята попытка получения олигонуклеотидопептидов с длинной пептидной цепочкой. Для активации концевой карбоксильной функции пептида авторы предложили использовать гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония (PyBOP).³⁴ Однако после деблокирования полученного олигонуклеотидопептида 33 и выделения целевого продукта масс-спектрометрический анализ показал, что его пептидный компонент содержит только два аминокислотных остатка (соединение 34).



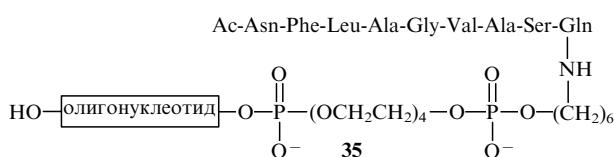
Авторы³⁴ считают, что расщепление пептидного компонента по амидной связи между остатками серина и глицина произошло вследствие $\text{N}\rightarrow\text{O}$ -ацильной миграции. По-видимому, образовавшаяся в результате обработки аммиаком свободная HO -группа серина атакует амидную связь между остатками серина и глицина, после чего происходит разрыв пептидной цепи из-за гидролиза сложноэфирной связи. Использование более мягкой процедуры для удаления защитных группировок (0.4 М NaOH в метаноле, 17 ч) также не дало положительных результатов. Для решения возникшей проблемы остаток глицина заменили на остаток аланина, чтобы создать стерические препятствия в месте возможной нуклеофильной атаки. Были осуществлены и некоторые другие изменения, необходимые для образования в будущем стабильного спирального комплекса между олигонуклеотидопептидом и комплементарной НК-мишенью: α -аминогруппа пептида была блокирована ацетильной защитой, а между 3'-концевым нуклеотидом и алкиламином ввели дополнительный тетраэтиленгликоловый мостик, чтобы

Схема 9

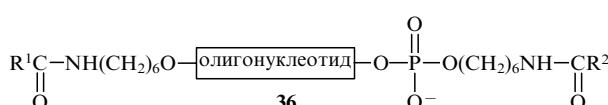


CPG — пористое стекло с контролируемым размером пор (Controlled pore glass), DMTr — 4,4'-диметокситритильная защитная группа, PyBOP — гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония.

«отодвинуть» пептидный фрагмент от цепи ДНК. В этом случае удалось достичь 72%-ного выхода конъюгата **35**.

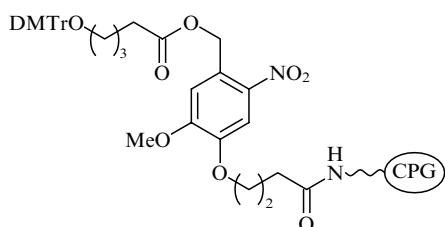


3'-5'-Бисконъюгаты 36 олигонуклеотидов с пептидами успешно получали, используя на первом этапе уже упомянутый полимерный носитель. По схеме 9 синтезировали 3'-конъюгаты олигонуклеотидопептидов, после чего проводили реакцию 5'-концевой НО-группы с коммерчески доступным (6-аминогексил)(2-цианэтил)-N,N'-диизопропиламинофосфитом и добавляли другой пептид.³⁵



R¹, R² – остатки пептидов.

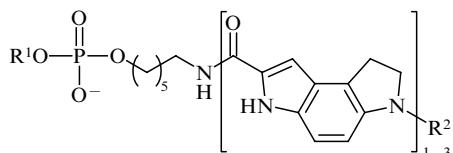
Естественным продолжением этих исследований стала работа³⁶ по использованию для синтеза олигонуклеотидопептидных конъюгатов защищенных олигонуклеотидов, содержащих 3'-концевую карбоксильную функцию. В этом случае также использовали УФ-расщепляемый полимерный носитель.



Ковалентная связь между 3'-концом олигонуклеотида и N-концом пептида образуется легко даже в случае пространственной затрудненности N-концевой аминокислоты. При присоединении тетрапептидов были продемонстрированы прекрасные результаты: конъюгаты получены с выходами 89–95%.

Следует также упомянуть о работе³⁷, в которой осуществлен синтез конъюгатов ряда пептидов с незащищенными олигонуклеотидами T₆ и T₁₀, содержащими NH₂-группу на 5'-конце. В качестве конденсирующего агента был использован РуBOP.

В статье³⁸ предложен метод получения ковалентных комплексов олигонуклеотидов с синтетическим аналогом пептидного антибиотика CC-1065.



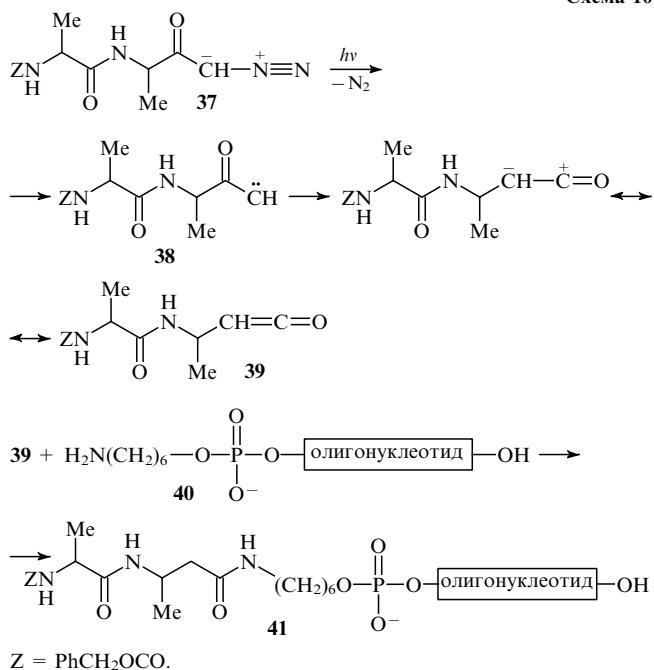
R¹ — олигонуклеотидная цепь, R² = CONH₂, Bos.

Метод включает в себя конденсацию 2,3,5,6-тетрафторфенилового эфира пептида и деблокированного олигонуклеотида с 5'- или 3'-концевой аминогруппой. Реакцию проводят в диметилсульфоксиде. Получение ДНК-фрагментов, содержащих аминогексильный остаток на 5'- или

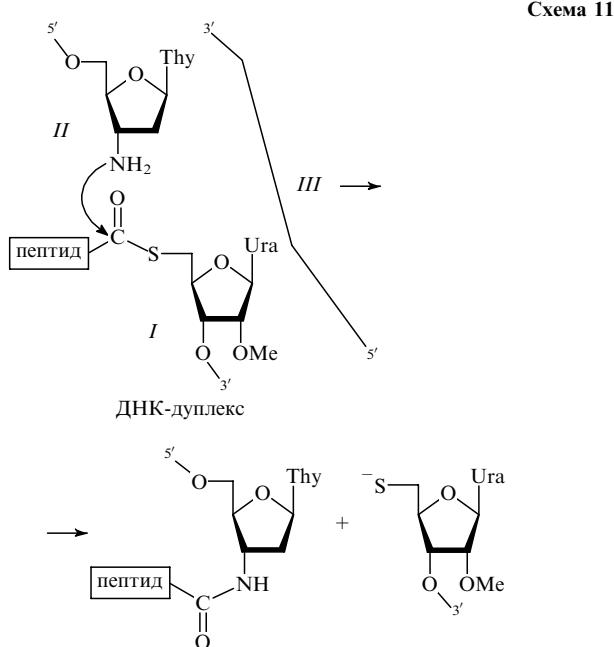
3'-конце, авторами подробно не обсуждается. Олигонуклеотиды вводили в реакцию в виде цетавлоновых солей. Выход продукта конденсации составлял 60–90% (ВЭЖХ-анализ). Авторы отмечают, что осаждение продуктов реакции добавлением к ним 2%-ного раствора LiClO₄ в ацетоне и их выделение с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ снижает общий выход до 15–50%.

Интересный подход к синтезу олигонуклеотидопептидов с амидной связью предложен швейцарскими учеными.³⁹ В основе разработанного ими метода лежит использование перегруппировки Вольфа. В качестве пептидного компонента авторы применили диазокетон **37**, а в качестве олигонуклеотидного — олиготимидилат. Реакцию проводили в диметилформамиде. Диазокетон **37** разлагается при УФ-облучении с отщеплением молекулы азота и образованием карбена **38**, который в результате перегруппировки Вольфа превращается в кетен **39** (схема 10). Последний взаимодействует с присутствующим в реакционной смеси олиготимидилатом **40**, содержащим 5'-концевую аминогруппу. Выход олигонуклеотидопептида **41** составляет 35%. Попытки ввести диазокетон **37** в реакцию с гетерополимерными молекулами ДНК оказались неудачными. Авторы объясняют это плохой растворимостью гетерополимеров в диметилформамиде. Еще одной причиной низких выходов может быть наличие в реакционной смеси молекул воды, которые конкурируют с олигонуклеотидами за взаимодействие с кетенами.

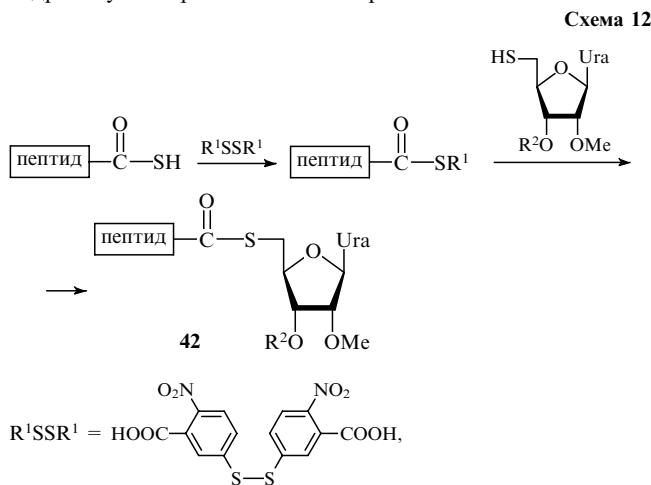
Схема 10



В обсуждаемых нами подходах к синтезу олигонуклеотидопептидов предполагается в основном использование реакций, протекающих в органических растворителях. В публикации американских исследователей⁴⁰ предложен оригинальный метод образования ковалентной связи между пептидом и олигонуклеотидом в водном растворе, для чего был применен метод химического лигирования. Его отличительной особенностью является сближение реагирующих групп концевых участков олигонуклеотидов *I* и *II* в результате комплементационных взаимодействий этих олигонуклеотидов с комплементарными им смежными участками олигонуклеотида *III* (схема 11).



Применяемые в работе⁴⁰ пептиды были синтезированы твердофазным методом с использованием полимерного носителя, позволяющего получать пептид в виде тиокарбоновой кислоты. Обработка таких пептидов реагентом Эллмана (*5,5'*-дитиобис(2-нитробензойной) кислотой) приводила к образованию *S*-эфира тиокарбоновой кислоты. Последний взаимодействовал с олигонуклеотидом, содержащим остаток 2'-*O*-метил-5'-дезокси-5'-тиоуридината, с образованием олигонуклеотидопептида **42** с *S*-сложнозифирной связью (схема 12). Реакцию проводили в течение 30 мин при 25°C в буферном растворе (рН 8) в присутствии спермилина. Авторы работы⁴⁰ отмечают, что образующийся продукт **42** устойчив при комнатной температуре в течение 24 ч, но легко гидролизуется при 37°C за то же время.



Ключевой стадией синтеза олигонуклеотидопептидов с амидной связью можно считать конденсацию пептида, присоединенного к однотяжевому фрагменту олигонуклеотида *I*, с олигонуклеотидом *II*, содержащим на 3'-конце 3'-амино-3'-дезокситимидин, в составе ДНК-дуплекса (см. схему 11). ДНК-Дуплекс представляет собой высокоупорядоченную систему, в месте разрыва которой концевая 3'-аминофункция олигонуклеотида *II* и тиоэфирная группировка олигонуклеотида *I* сближены на достаточное расстояние и однозначно

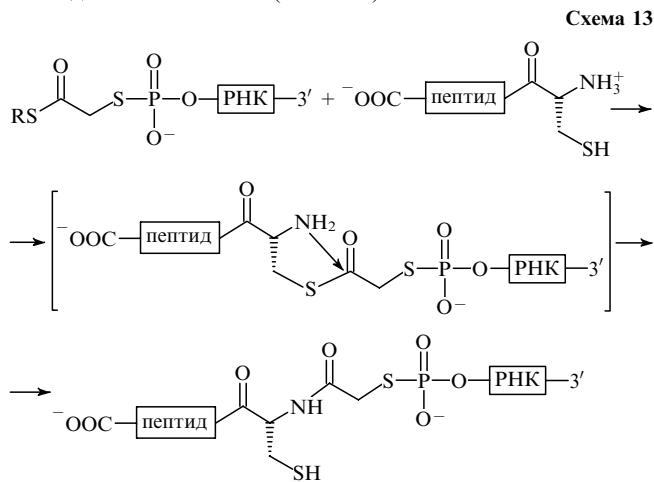
ориентированы в пространстве за счет взаимодействий, стабилизирующих двойную спираль. Следствием этого являются высокая селективность и скорость протекания химической реакции, недостижимая для аналогичных превращений вне спирального комплекса. Конденсация протекала в оптимальных условиях (2–4 ммоль спермилина, рН 8, 37°C) за 15–30 ч; олигонуклеотидопептиды были получены с хорошими выходами (60–85%). Этому способствовал слабощелочной характер среды, в результате чего 3'-аминогруппа оставалась непротонированной, а также наличие в реакционной смеси спермилина, который дополнительно стабилизировал ДНК-дуплекс.

Предложенный подход позволяет синтезировать одновременно несколько олигонуклеотидопептидов различного строения. Это становится возможным, когда олигонуклеотид с 3'-аминогруппой участвует в образовании сразу двух разных ДНК-дуплексов, что и было продемонстрировано в данной работе.

В конденсацию с олигонуклеотидами были вовлечены пептиды различной длины. Однако в случае коротких пептидов возникали серьезные трудности в проведении реакции, так как для них возможно образование циклических структур. Это связано с тем, что не только 3'-аминогруппа ДНК-фрагмента, но и α -аминогруппа пептида может атаковать карбонильный атом углерода, что приводит к образованию циклического пептида. Кроме того, чтобы конденсация проходила эффективно, нужно учитывать еще один немаловажный момент: С-концевой аминокислотный остаток пептида не должен содержать разветвленную боковую цепь, т.е. на С-конце не должны находиться изолейцин и треонин.

В обсуждаемой статье⁴⁰ описан еще один интересный эксперимент. Он заключается в использовании на стадии конденсации немодифицированного олигонуклеотида с 3'-концевой гидроксильной группой. В этом случае происходит образование сложноэфирной связи между пептидом и ДНК-фрагментом; выход олигонуклеотидопептидов со сложноэфирной связью меньше, чем с амидной. Сложноэфирная связь, в отличие от амидной, легко гидролизуется в щелочной среде (0.01 М NaOH) при 25°C за 1 ч.

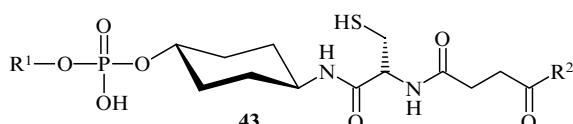
Позже появилось сообщение⁴³ о селективном нематричном химическом лигировании модифицированной РНК с *S*-сложнозифирной группой на 5'-конце и полипептидов с цистеиновым остатком на N-конце, приводящем к 5'-РНК-пептидным конъюгатам (схема 13).



Реакция осуществлялась посредством перетиоэтерификации и последующей спонтанной внутримолекулярной перегруппировки с образованием пептидной связи. Авторы отмечают высокую селективность лигирования (50%-ный выход конъюгата 102-членной РНК с 13-членным пептидом)

при низких микромолярных концентрациях компонентов. Реакция протекает в неденатурирующих условиях, благодаря чему удается получать НК-белковые конъюгаты с сохранением нативной структуры белка. Синтез пептидов, несущих N-концевой цистeinовый остаток, не вызывает трудностей. 5'-Концевой тиофосфатный остаток может быть легко введен в рибо- или дезоксирибонуклеиновую кислоту химически или ферментативно.

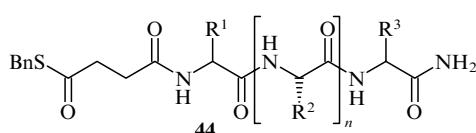
«Нативным лигированием» (по аналогии с известной из пептидной химии⁴⁴ конденсацией двух незащищенных пептидных фрагментов, один из которых содержит C-концевой S-тиокарбоксилат, а другой — N-концевой цистеин) называют авторы недавних публикаций^{45,46} предложенный ими новый метод получения олигонуклеотидопептидов **43** (в отсутствие матрицы).



R¹ — фрагмент олигонуклеотидной цепи,

R² — фрагмент пептидной цепи.

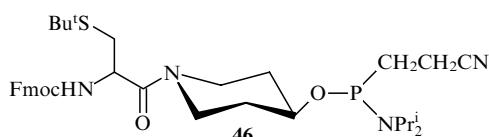
В основе метода лежит реакция пептида **44**, модифицированного введением S-сложнозифирной группировки на N-конец, с олигонуклеотидом, содержащим на 5'-конце остаток цистеина, который вводят с помощью соединения **45**.



R¹, R², R³ — боковые цепи аминокислот.



S-Бензилтиосукцинат **44** был получен на последней стадии в стандартном автоматическом пептидном синтезе (Fmoc-стратегия). Амидофосфит *O*-транс-4-(N^z-Fmoc-S-*трет*-бутил-L-цистеинил)аминоциклогексанола **45** вводили на 5'-конец олигонуклеотида при стандартном твердофазном амидофосфитном синтезе. В работе⁴⁶ описано также получение другого амидофосфитного синтона **46** на основе 4-гидроксипиперидина.



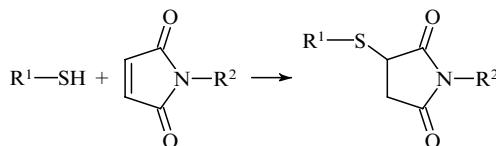
Пептид **44** и модифицированный с помощью соединения **45** (или **46**) олигонуклеотид после деблокирования и отщепления от смолы без дополнительной очистки вводили в реакцию. Конденсацию проводили в водно-органических растворах с добавлением три(2-карбоксиэтил)fosфина (для удаления S-*трет*-бутильной группы *in situ*) и тиофенола (для повышения эффективности тиольного обмена).

В работе⁴⁵ даны примеры реакций с использованием пептидов и олигонуклеотидов различных последовательнос-

тей и длины и рассмотрены способы повышения их эффективности. Олигонуклеотидопептид **43** во всех случаях являлся основным продуктом, в ряде примеров его выход достигал 75%. Побочная реакция — внутримолекулярная циклизация с участием сукцинильного фрагмента в составе пептида — наблюдалась лишь при наличии глицина на N-конце. Несомненно, необходимы дальнейшие эксперименты по оптимизации состава растворителя, условий реакции (особенно для длинных пептидов, имеющих вторичную структуру). Однако уже сейчас ясно, что с использованием предложенной методики⁴⁵ можно получать конъюгаты олигонуклеотидов с очень широким набором пептидов (с небольшими ограничениями в последовательности). Данный способ имеет преимущества перед рассмотренным ранее методом получения РНК-пептидных конъюгатов,⁴³ так как он позволяет использовать пептиды, содержащие тиоэфиры как на C-, так и на N-конце, а также применять 5'-цистеинилзамещенный олигонуклеотид, полученный стандартным амидофосфитным методом. Метод, предложенный авторами работы⁴³, позволяет использовать только N-концевые цистеинодержащие пептиды и РНК, модифицированные 5'-тиофосфатом.

4. Конъюгаты с сульфидной связью между фрагментами

Оптимальным представляется такой вариант синтеза олигонуклеотидопептидов, при котором реакционноспособная группировка в составе олигонуклеотида избирательно реагирует с реакционноспособной группировкой в пептиде, в то время как другие функциональные группы обеих макромолекул остаются незатронутыми. Например, для конъюгации можно использовать реакцию присоединения тиолов к малеинимидам.

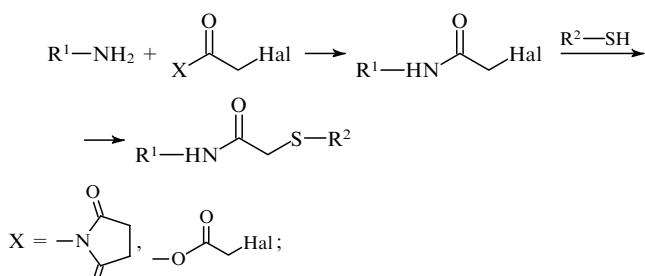


R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной или пептидной цепи.

Сульфгидрильную или малеинимидную активные группировки предварительно вводят в олигонуклеотид или пептид с помощью различных реагентов. В то же время следует отметить, что одним из реакционных центров может быть HS-группа остатка цистеина, изначально входящего в состав пептида. Как правило, предпочитают, чтобы сульфгидрильная группа находилась в составе олигонуклеотида, а малеинимидная группировка — в составе пептида.^{47–58} Однако существует также и альтернативный вариант,^{59–63} когда HS-группа N- или C-концевого остатка цистеина взаимодействует с малеинимидной группой, встроенной в олигонуклеотидную цепь.

В обоих случаях реакцию проводят в водной или водно-органической среде (pH 6.0–7.2) при комнатной температуре. Почти всегда пептид берут в избытке (от 4 до 15 экв.), и только в одной работе⁴⁸ соотношение между двумя компонентами в реакционной смеси составляло 1:1. Время проведения реакции варьирует от 1 до 20 ч. Выходы конъюгатов колеблются в достаточно широких пределах — от 30 до 90%.

Образование простой тиоэфирной связи между олигонуклеотидом и пептидом также может происходить и в результате нуклеофильной атаки HS-группы на атом углерода галогенацетильного производного. С этой целью в олигонуклеотиды или пептиды встраивают остаток галогенуксусной кислоты.^{64–72}

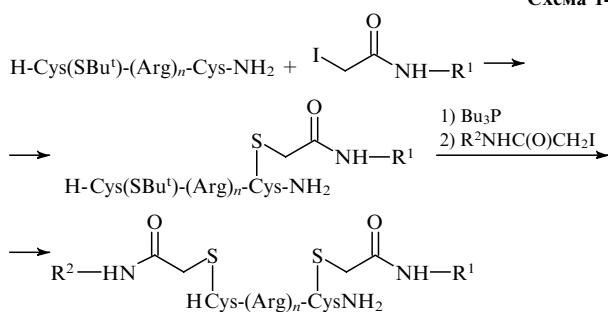


R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной или пептидной цепи.

Как правило, олигонуклеотид, имеющий в своем составе иодацетильную группировку, взаимодействует с избытком цистеинсодержащего пептида в нейтральной среде при комнатной температуре.^{64–67} Время реакции составляет 12–20 ч. Выходы конъюгатов обычно колеблются в пределах от 55 до 98%. В работе⁶⁸ синтез проводили в слабощелочной среде (рН 8.3). Авторы приводят интересные данные о зависимости скорости реакции от суммарного заряда пептида. Так, реакция между модифицированным олигонуклеотидом и пептидом, содержащим один остаток аргинина и четыре остатка лизина (суммарный заряд равен +5), протекает за несколько минут. В случае двух других пептидов, суммарные заряды которых равны +1 и 0, необходимое время реакции составляет соответственно 3 и 20 ч. Авторы полагают, что увеличение скорости конденсации происходит из-за электростатического взаимодействия отрицательно заряженных фосфатов в молекуле ДНК с положительно заряженными боковыми группами лизина и аргинина.

В работе⁶⁴ описан синтез олигонуклеотидопептидов, в которых два фрагмента ДНК соединены между собой пептидным мостиком (схема 14). В качестве мостика американские исследователи применяли H-Cys(SBu^t)-(Arg)_n-Cys-NH₂ ($n = 3, 5, 7$).

Схема 14



R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидных цепей; $n = 3, 5, 7$.

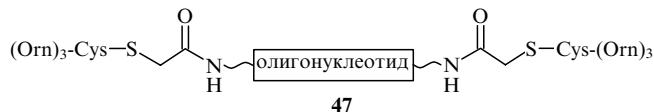
Сначала свободная HS-группа С-концевого остатка цистеина взаимодействовала с иодацетильной группировкой, локализованной на 5'-конце одного олигонуклеотида. Чтобы предотвратить удаление S-*tert*-бутильной группы, необходимо было проводить реакцию в нейтральной среде. После ее завершения и хроматографического выделения олигонуклеотидопептида вторую меркаптогруппу деблокировали под действием большого избытка трибутилфосфина при комнатной температуре в течение 4 ч. Из-за плохой растворимости трибутилфосфина в воде удаление защитной группы осуществляли в двухфазной системе вода–хлористый метилен.

Авторы указывают, что трибутилфосфин обладает важным преимуществом перед дитиотреитом — реагентом, широко применяемым для восстановительного расщепления связи S—S. После завершения реакции избыток дитиотреита нужно удалять, в то время как при использовании третичного

фосфина можно ограничиться лишь отделением органической фазы от водной. Установлено, что следует дождаться полного отщепления S-*tert*-бутильной группы, и только после этого в реакционную смесь добавлять другой олигонуклеотид, содержащий иодацетильную группировку на 3'-конце. В противном случае удаление S-защитной группы будет происходить медленно, так как иодуксусная кислота и ее амид могут образовывать с Bu₃P четвертичные фосфоневые соли.

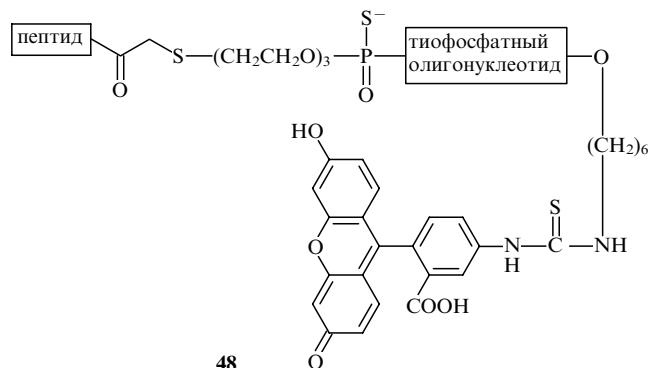
Взаимодействие HS-группы N-концевого остатка цистеина в олигонуклеотидопептиде с электрофильным центром второго олигонуклеотида протекало в слабощелочной среде. Это способствовало увеличению выхода целевого продукта. Следует также отметить, что в работе⁶⁴ все реакции проводили в растворе хлорида лития. Авторы объясняют это тем, что олигонуклеотидопептид плохо растворим в воде из-за взаимодействия фосфатных групп ДНК с положительно заряженными гуанидиновыми группами остатков аргинина, а присутствие хлорида лития ослабляет эти взаимодействия. В то же время олигонуклеотидные пары, содержащие пептидный мостик, хорошо растворимы в воде, так как имеют в своем составе избыточное (по отношению к гуанидиновым группам) количество отрицательно заряженных фосфатов.

С использованием описанного выше подхода был получен также коньюгат **47**, в котором к 3'- и 5'-концам олигонуклеотида были присоединены два пептидных фрагмента.



В работах^{69–72} в пептидный фрагмент сначала вводили остаток бромуксусной кислоты, а затем проводили конденсацию с олигонуклеотидом, содержащим HS-группу. При этом использовали избыток бромацетильного производного пептида (от 5 до 25 экв.). Реакцию вели при комнатной температуре в течение 5–20 ч. Выход целевого продукта составлял 70–100%. В работе⁶⁹ изучали влияние кислотности среды (рН 7.0, 7.5, 7.9 и 8.5) на полноту протекания реакции, а также зависимость скорости реакции от температуры. Было обнаружено, что при 40°C и рН 7.0 и 7.5 олигонуклеотидопептид образуется с количественным выходом меньше чем за 3 ч.

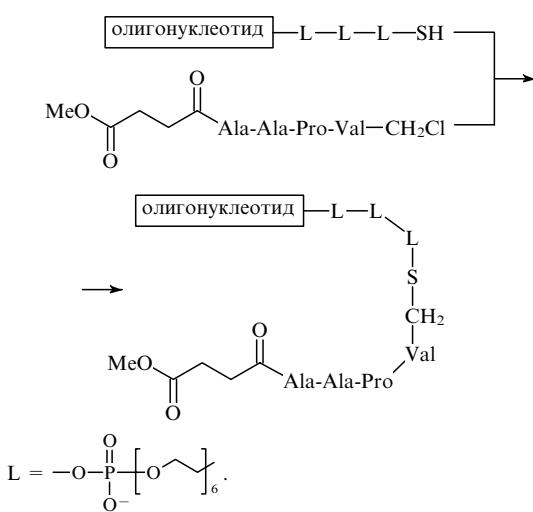
В качестве иллюстрации успешного применения описанного выше метода к синтезу олигонуклеотидопептидов приведем публикацию⁷², в которой сообщается о получении достаточно сложного флуоресцентно-меченного олигонуклеотидопептида **48**. Для этого сначала синтезировали 19–25-членные тиофосфатные олигодезоксирибонуклеотиды с защищенной тиольной группой на 5'-конце и аминогруппой на конце линкера, присоединенного к 3'-концу. Такой



бисфункционализированный олигонуклеотид вводили в реакцию с флуоресцентной флуоресценцизиотиоцианатной (FITC) меткой по 3'-аминогруппе, затем деблокировали тиофункцию и замещали ее на N-бромацетильное производное пептида.

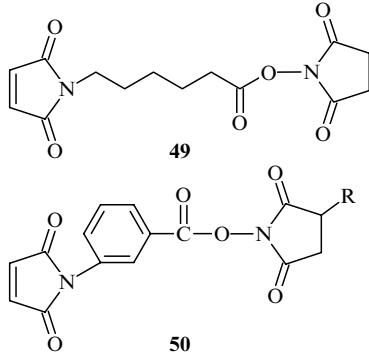
Особо подчеркивается возможность осуществления масштабного синтеза конъюгата **48**. Успешному достижению поставленной цели послужила новая процедура деблокирования защищенных олигонуклеотидов: олигомеры обрабатывали смесь дипиридилидисульфида и концентрированного аммиака в присутствии фенола и метанола. Такая деблокирующая смесь позволяет отщепить олигонуклеотид от полимерного носителя с высвобождением 3'-концевой аминогруппы, деблокировать фосфатные группы и аминофункции гетероциклических оснований и трансформировать 5'-концевую тиоацетильную защитную группу в пиридилидисульфидную. Присутствие в деблокирующей смеси фенола дает возможность избежать побочной реакции, протекающей при масштабном синтезе. Обычно при деблокировании межнуклеотидных фосфатов образуется электрофил — акрилонитрил ($\text{CH}_2 = \text{CHCN}$), реагирующий по нуклеофильной сере системы олигонуклеотид—линкер—SH с образованием продукта олигонуклеотид—линкер— $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$.

В работе⁷³ описан синтез олигонуклеотидопептидов, в основе которого лежит реакция пептидилхлорметилкетона с олигонуклеотидом, содержащим меркаптогруппу на 3'-конце (схема 15).

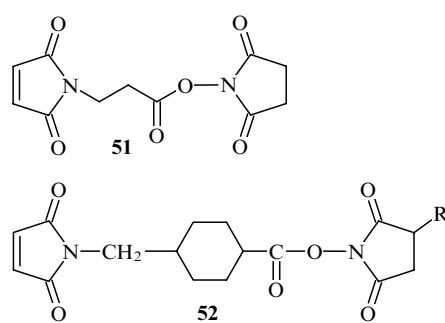


Конъюгацию олигонуклеотида с пептидом осуществляли в водно-органическом растворе (рН 7.5) при комнатной температуре в течение 12–16 ч. Выход целевого продукта составил 60%.

В качестве гетеробифункциональных реагентов, применяемых для введения малеинимидной группировки в пептиды и олигонуклеотиды, использовали активированные эфиры ε -малеинимидогексановой (49),^{47,48} 3-малеинимидо-



Cxema 15



R = H, SO₃Na.

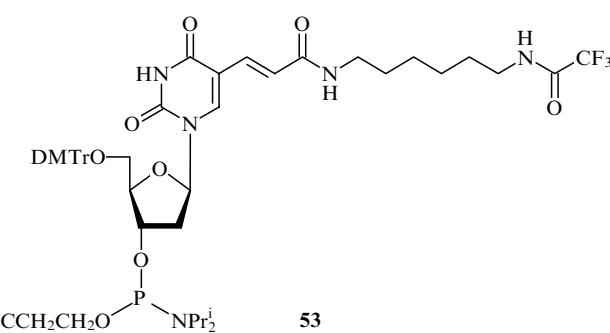
бензойной (50),^{51, 53, 54, 59, 60} β -малеинимидопропионовой (51)^{55, 56} и 4-малеинимидометилциклогексанкарбоновой (52)^{57, 61–63} кислот.

В работе⁴⁸ для встраивания малеинимидной группировки в пептид α -аминогруппу последнего ацилировали реагентом **49** в водном растворе при pH 7. Авторы работы⁴⁷ проводили эту реакцию в метаноле в присутствии триэтиламина. В большинстве случаев пептид синтезировали твердофазным методом, и после удаления защитной группировки ацилировали свободную α -аминогруппу каким-либо из приведенных выше бифункциональных реагентов в присутствии 1-гидроксибензотриазола.^{51, 53–56}

Испанские исследователи⁵¹ отмечают, что малеинимидные производные пептидов, содержащие в своем составе остатки лизина, недостаточно устойчивы при хранении в водном растворе. Через 3–4 дня наблюдается образование сложной смеси продуктов в результате взаимодействия ε-аминогрупп остатков лизина с малеинимидной группировкой. Чтобы предотвратить протекание побочных реакций, предлагается сразу же после отщепления модифицированного пептида от полимерного носителя без хроматографического выделения вводить его в реакцию.

Для введения остатка бромуксусной кислоты в пептиды французские исследователи⁶⁹⁻⁷¹ предложили ацилировать α -аминогруппу пептида ангидридом бромуксусной кислоты в процессе твердофазного пептидного синтеза.

Синтез малеинимидных производных олигонуклеотидов состоит из двух этапов. Сначала проводят автоматический синтез олигонуклеотидов, на последней стадии которого образовавшуюся олигомерную цепь модифицируют [6-(4-монометокситритил)аминогексил](2-циантил)-*N,N*-дизопропиламидофосфитом.^{59–62} Французские исследователи⁶³ вводили алифатическую аминогруппу в заранее заданное положение ДНК-фрагмента с помощью коммерчески доступного 3'-амидофосфитного производного модифицированного нуклеозида **53**.



После отщепления полученного олигонуклеотида от полимерного носителя и удаления защитных группировок на алифатическую аминогруппу действовали одним из гетеробифункциональных реагентов **49–52**, содержащих малеинимидную группу, при pH 7–8. Выходы малеинимид-

ных производных олигонуклеотидов обычно составляют 60–70%.

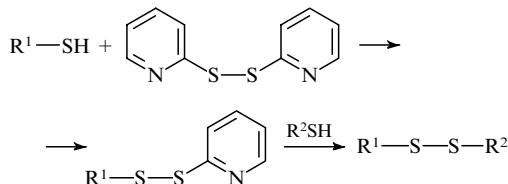
Методы получения олигонуклеотидов, содержащих остаток иодуксусной кислоты, аналогичны. Аминогруппу, присоединенную к 3'- или 5'-концу олигонуклеотида с помощью гексаметиленового мостика, ацилируют в водно-органической среде *N*-гидроксисукциниимидным эфиром^{64–66} или ангиридом иодуксусной кислоты.⁶⁸

5. Коньюгаты с дисульфидной связью между фрагментами

До сих пор речь шла о методах получения коньюгатов, в которых олигонуклеотидный и пептидный компоненты были соединены достаточно прочной ковалентной связью. Вместе с тем не менее актуальной задачей является разработка методов синтеза олигонуклеотидопептидов с легко расщепляемой связью между фрагментами. Такой связью может быть S–S-связь, которая способна образовываться и разрываться в приемлемых для проведения биологических процессов условиях.

Для получения коньюгатов с дисульфидной связью между пептидным и олигонуклеотидным фрагментами используют три основных приема. Первый заключается в окислении HS-группы олигонуклеотида и пептида кислородом воздуха с образованием дисульфидного мостика. При этом пептид берется в избытке. В этом случае, как сообщают авторы работы⁶¹, выход коньюгата составляет 60%. Напротив, Ажаев с сотр.⁷⁴ отмечает, что выходы олигонуклеотидопептидов, полученных с использованием данного подхода, крайне низкие — 0.4–23%.

Два других приема заключаются в активации SH-группы олигонуклеотида или пептида 2,2'-дипиридилидисульфидом.^{61,74–81}



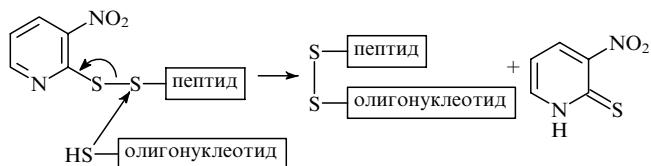
R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной или пептидной цепи.

Реакцию проводят в мягких условиях при комнатной температуре.

Незащищенные пептиды и олигонуклеотиды способны образовывать нековалентные комплексы за счет электростатического взаимодействия отрицательно заряженных фосфатов в составе ДНК с положительно заряженными боковыми группами пептидов. Такие комплексы осаждаются из растворов. Учитывая данное обстоятельство, в реакционную смесь специально добавляют хлорид калия и ацетонитрил, которые нейтрализуют заряды молекул и способствуют их растворению.⁷⁶ Предлагается также проводить синтез коньюгатов в среде 90%-ного формамида.⁷⁴

Отличительной особенностью метода, предложенного в работах^{51,69}, является введение в полипептидную цепь в процессе твердофазного синтеза остатка Вос-зашитенного по α -аминогруппе S-(3-нитро-2-пиридилсульфенил)цистеина (Cys^{Npys}). Важно то, что Npys-защитная группа устойчива в условиях кислотной обработки. Образовавшийся в результате твердофазного синтеза пептид после отщепления от полимерного носителя и снятия защитных групп (кроме Npys-группы) вводят в реакцию с фрагментом ДНК, содержащим HS-группу. Реакцию проводят в мягких условиях. В результате взаимодействия HS-группы олигонуклеотида с Npys-защищенной сульфидрильной группой цистеинового

остатка полипептида образуется коньюгат с S–S-связью между пептидным и олигонуклеотидным фрагментами.



Следует отметить, что существует несколько способов введения HS-группы в олигонуклеотиды. Во-первых, она может быть присоединена к 3'- (см. работы^{54,56}) или 5'-концу (см. работы^{51,53,55}) фрагмента ДНК с помощью линкеров различной длины. Во-вторых, можно синтезировать защищенный 3'-амидофосфит нуклеозида, имеющий в своем составе меркаптогруппу, и в процессе автоматического олигонуклеотидного синтеза ввести его в любое заранее заданное положение олигомерной цепи.

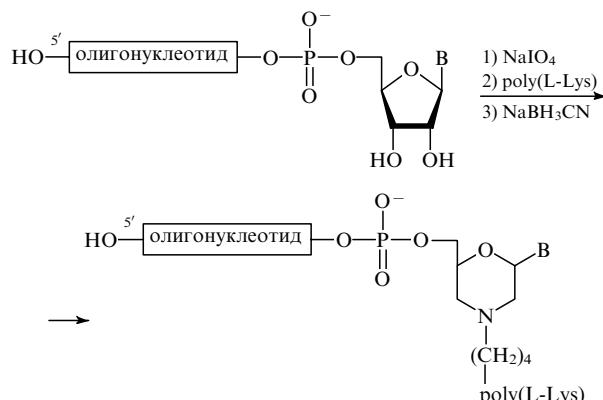
Выше отмечалось, что для коньюгации с олигонуклеотидами обычно применяют цистеинодержащие пептиды. Однако разработаны методы, позволяющие вводить HS-группы в пептиды, которые не имеют в своем составе остатков цистеина. Так, в работе⁷⁴ β -меркаптопропионовую кислоту присоединяли к N-концевому аминокислотному остатку в процессе твердофазного пептидного синтеза.

6. Синтез коньюгатов с использованием карбонильного производного одного из фрагментов

В рассматриваемых ниже работах в основе получения коньюгатов лежат реакции карбонильных соединений с нуклеофилами. Карбонильные группы имеют неоспоримое достоинство, так как не требуют дополнительной активации, и реакции с их участием проходят достаточно селективно.

Диальдегидные производные нуклеиновых кислот ранее широко использовали, например, для установления строения мономерных компонентов РНК и ДНК. Методы введения альдегидных групп в углеводные фрагменты нуклеиновых кислот и свойства таких модифицированных производных недавно рассмотрены в обзорах^{82,83}.

Лебле и соавт.^{84–89} успешно применили диальдегидные производные олигонуклеотидов для получения олигонуклеотидопептидов. После периодатного окисления олигонуклеотида с 3'-концевым рибозеном его вводили в реакцию с поли(L-лизином) с последующим восстановлением цианборгидридом натрия. Связь между пептидным и олигонуклеотидным фрагментами осуществлена через образующееся в результате реакции морфолиновое кольцо.



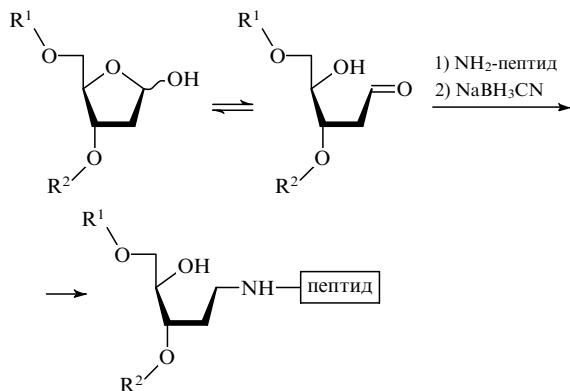
Отметим, что в работе⁸⁴ в качестве олигонуклеотида с 3'-концевым рибозеном использовали (2'-5') $(A)_n$ -полирибонуклеотид, полученный ферментативно, в исследова-

ний⁸⁵ 3'-концевое рибозевено вводили в олигодезоксирибонуклеотид с помощью T4 РНК-лигазы, а в работе⁸⁷ для получения такого олигонуклеотида применяли полимерный носитель с присоединенным к нему первым рибозевеном, на котором затем вели автоматический синтез.

В первых работах Лебле и соавт.^{84–87} сообщалось об антисмысовых свойствах конъюгатов диальдегидных производных олигонуклеотидов с пептидами и о возможности их использования для изучения различных биологических систем, а позднее были опубликованы результаты^{88, 89} тестирования таких комплексов на способность ингибировать репликацию ВИЧ-1 (олигонуклеотидный фрагмент комплекса был комплементарен участку инициации трансляции Tat-белка). Были отмечены сиквенс-специфические антивирусные эффекты.

В работе⁹⁰ электрофильный центр в олигонуклеотидах генерировали ферментативно: выщепляли урацил из олигонуклеотидной цепи с помощью урацил-ДНК-гликозилазы, в результате получали апурин/апиримидиновый фрагмент. Далее осуществляли модификацию альдегидсодержащего олигонуклеотида различными лигандами, несущими аминогруппу. В частности, описано присоединение к таким олигонуклеотидам трипептидов (схема 16).

Схема 16



R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

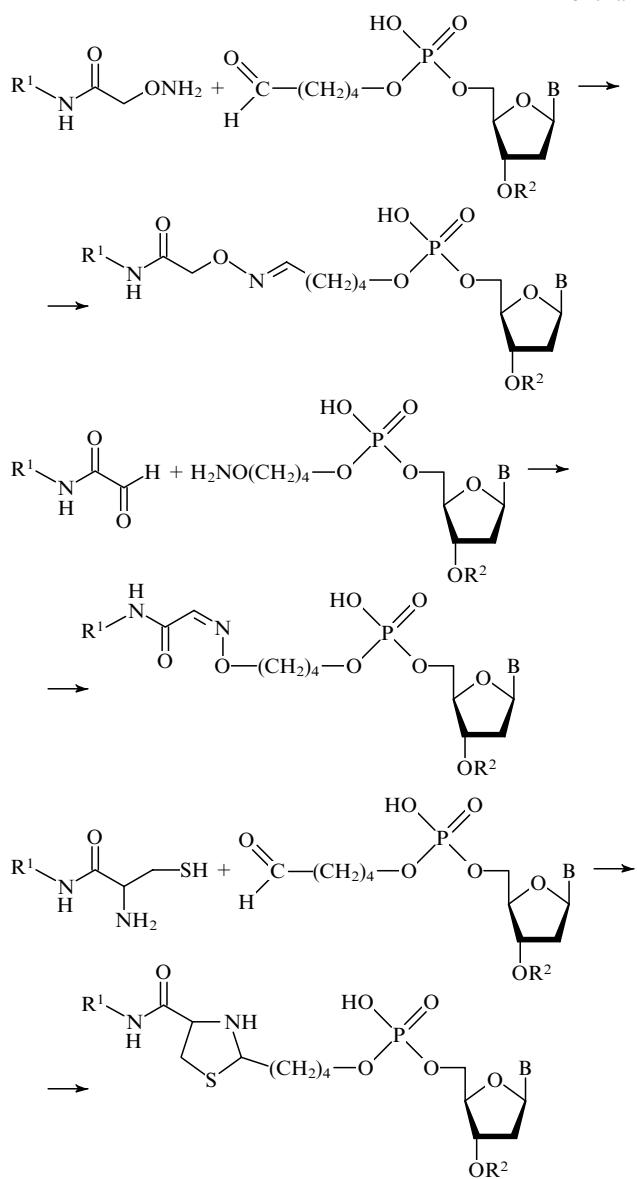
Высокоэффективный селективный метод синтеза олигонуклеотидопептидов через образование оксимов и тиазолидинов предложен в недавнем сообщении⁹¹. В поисках идеального варианта конъюгации, т.е. простейшей одностадийной реакции между свободными пептидом и олигонуклеотидом в физиологических условиях, авторы остановились на двух новых типах связующих группировок между фрагментами — оксимной и тиазолидиновой.

На схеме 17 представлен синтез конъюгатов через образование оксима (реакция альдегида с аминооксипроизводным) и тиазолидина (реакция альдегида с 1,2-аминотиолом).

Альдегидная или аминооксифункции были встроены в олигонуклеотидный фрагмент по 5'-концу, а пептид содержал соответствующую комплементарную функцию: аминоокси- и 1,2-аминотиольную группы для реакции с альдегидсодержащим олигонуклеотидом или α -N-глиоксилоильную группу для реакции с аминооксипроизводным олигонуклеотида.

5'-Модифицированные олигонуклеотиды получали в процессе стандартного автоматического синтеза с использованием на последней стадии соответствующих модифицированных 3'-амидофосфитных производных.⁹¹ В свою очередь, N-концевое положение или боковую цепь лизина в пептидах функционализировали альдегидной или аминооксигруппами путем окислительного расщепления остатка серина или с

Схема 17



R¹ — фрагмент пептидной цепи,

R² — фрагмент олигонуклеотидной цепи.

использованием N-Вос-*O*-(карбоксиметил)гидроксиламина соответственно.

Тиазолидиновый цикл между пептидом и олигонуклеотидом образуется в том случае, когда исходный пептид модифицирован цистеином по N-концу или по боковой цепи лизина.

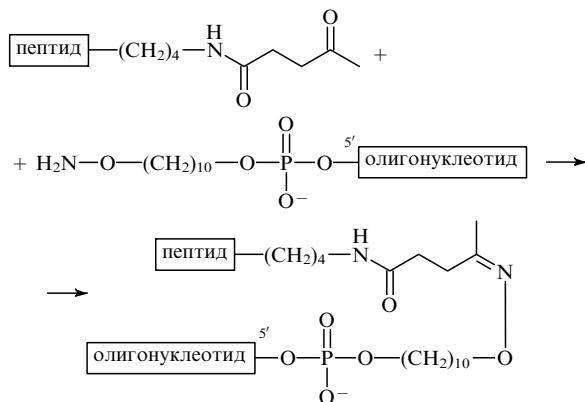
Образование оксима возможно и в составе ДНК-дуплекса. В этом случае 5'-альдегидсодержащий олигонуклеотид гибридизуют с комплементарной ДНК-цепью, и такой ДНК-дуплекс вводят в реакцию с пептидом, несущим аминооксигруппу. Данная стратегия открывает новые перспективы для постсинтетической модификации одно- и двухцепочечных ДНК.

Реакция образования оксимной связи между олигонуклеотидным и пептидным фрагментами характеризуется быстротой и селективностью. Однако олигонуклеотиды с аминооксифункцией редко вводят в реакцию с пептидами, содержащими альдегидную группу, так как такие олигонуклеотиды легко взаимодействуют с любыми карбонильными группами и не удобны в работе. Олигонуклеотидопеп-

тиды, в которых связь между олигонуклеотидным и пептидным фрагментами осуществляется через тиазолидиновый цикл, менее устойчивы, чем олигонуклеотидопептиды с оксимной связью.

Позже те же авторы⁹² привели данные о синтезе конъюгатов с использованием олигонуклеотидов с 3'-концевой карбонильной функцией. Альдегидная группа на 3'-конце была генерирована мягким периодатным окислением 1,2-аминоспирта, встроенного на 3'-конец олигонуклеотида при автоматическом синтезе с использованием стандартного коммерчески доступного полимера. Полученный таким путем олигонуклеотид реагировал с пептидом, содержащим аминооксигруппу, аналогично 5'-альдегидсодержащему олигонуклеотиду.⁹¹

Другая группа исследователей⁹³ параллельно опубликовала результаты по синтезу олигонуклеотидопептидов на основе олигонуклеотидов, содержащих аминооксифункцию на 5'-конце, и пептидов с N-концевым лизином, боковая цепь которых модифицирована левулиновым ангидридом, т.е. пептидов с N-концевой кетогруппой. В этом случае связывание олигонуклеотидного и пептидного фрагментов происходит в результате образования оксима.



В работе⁹⁴ также описано получение конъюгатов посредством образования оксимов. Кетофункция, участвующая в образовании оксимной связи, включена в C(5)-положение урацила в составе олигонуклеотида через спайсерное звено.

III. Твердофазный синтез олигонуклеотидопептидов

Проведение химических реакций на нерастворимых полимерных носителях является одним из основных приемов современного органического синтеза. Идея, которая лежит в основе данного метода, практически универсальна и применима для получения различных биополимеров и их аналогов. Твердофазный метод за последние несколько десятилетий прочно вошел в практику синтеза пептидов и олигонуклеотидов, поэтому исследователи уделяют большое внимание разработке стратегии и тактики химического синтеза олигонуклеотидопептидов, который протекал бы полностью или частично на твердой фазе.

В основе стратегии лежит способ построения последовательности аминокислот и нуклеотидов, причем различают постадийное наращивание пептидной и олигонуклеотидной цепей на одном полимерном носителе и конденсацию двух уже готовых фрагментов. Второй вариант подразумевает присоединение готового пептида к синтезированному твердофазным методом олигонуклеотиду, иммобилизованному на полимерном носителе.

При разработке тактики химического синтеза олигонуклеотидопептидов основное внимание уделяют выбору

оптимальных методов образования амидных и фосфодиэфирных связей, а также поиску подходящего сочетания защитных группировок для блокирования функциональных групп пептидов и фрагментов нуклеиновых кислот и условий их деблокирования (последние должны быть подобраны с учетом стабильности целевого олигонуклеотидопептида). Важной задачей является также выбор способа создания связи между пептидной и олигонуклеотидной частями молекулы.

1. Последовательный синтез пептидного и олигонуклеотидного фрагментов на одном полимерном носителе

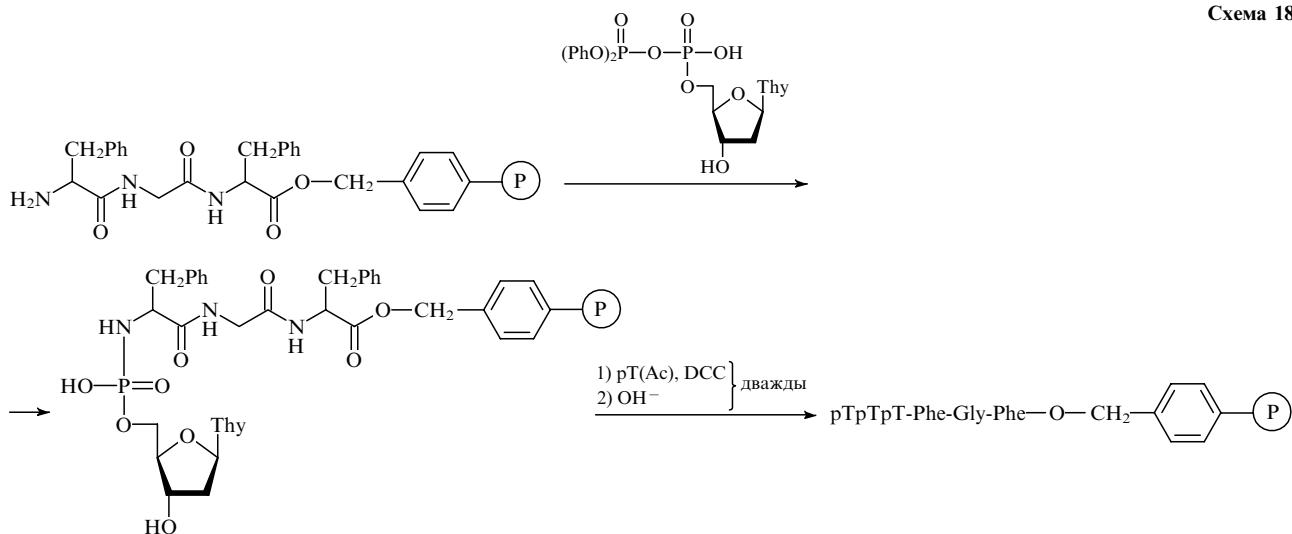
Процесс получения олигонуклеотидов и пептидов состоит в проведении серии периодически повторяющихся операций с участием достаточно близких по структуре мономерных компонентов. При последовательном синтезе олигонуклеотидного и пептидного фрагментов гибридной молекулы на одном полимерном носителе может возникать ряд серьезных проблем. Эти проблемы связаны с принципиальной невозможностью объединения некоторых процедур, которые являются стандартными в процессе твердофазного синтеза олигонуклеотидов и пептидов. Поэтому, чтобы добиться приемлемого выхода целевого соединения и избежать образования побочных продуктов, необходимо тщательно подобрать методики и оптимизировать условия проведения реакций.

В 1972 г. М.А.Прокофьевым, З.А.Шабаровой и сотр. была опубликована принципиально важная работа⁶, в которой они впервые описали твердофазный метод синтеза олигонуклеотидопептидов (схема 18).

Авторы использовали классический носитель Меррифилда, представляющий собой хлорметилированный сополимер полистирола с 2% дивинилбензола. Синтез пептидного фрагмента проводили с использованием Вос-защищенных аминокислот и N,N'-дициклогексилкарбодиимида в качестве конденсирующего агента. Авторы отмечают, что выбор аминокислот определялся стремлением избежать осложнений в процессе отщепления целевого продукта от полимера. Для присоединения первого нуклеотида к пептидил-полимеру применяли так называемый пироfosфатный метод. Он заключается в активации фосфатной группы нуклеотида за счет образования смешанного ангидрида с дифенилфосфатом. Реакцию проводили в среде абсолютного диметилформамида с применением десятикратного избытка смешанного ангидрида тимидин-5'-фосфата и дифенилфосфата (20°C, 100 ч). Для наращивания олигонуклеотидной цепи использовали фосфодиэфирный метод. Конденсацию осуществляли в абсолютном пиридине с применением пяти- или десятикратного избытка 3'-O-ацетилтимидин-5'-фосфата и пятикратного избытка DCC по отношению к количеству тимидил-(5' → N)-Phe-Gly-Phe. Для деблокирования 3'-гидроксильной группы нуклеотидного остатка использовали раствор щелочи в водном диоксане (pH 9). Такая обработка позволила полностью удалить ацетильную защиту, практически избежав отщепления динуклеотидил-(5' → N)-пептида от полимера.

На заключительном этапе для снятия олигонуклеотидопептида с полимерного носителя проводили гидролиз. Авторы столкнулись с серьезными трудностями при попытке расщепить сложноэфирную связь между полимером и три-нуклеотидил-(5' → N)-пептидом как вследствие пространственных затруднений, так и из-за невозможности использования для этой цели сильных кислот, поскольку их применение влечет за собой разрыв фосфамидной связи. Наибольшая степень расщепления сложноэфирной связи (10%) дости-

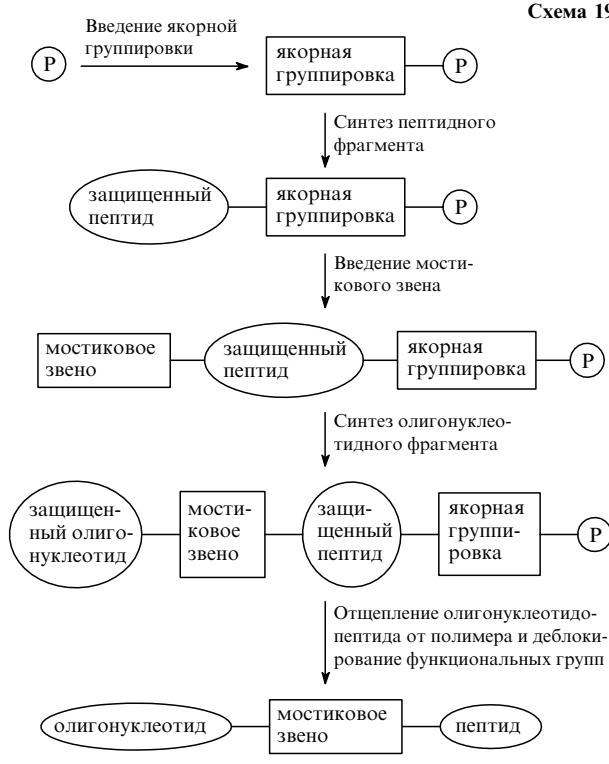
Схема 18



гается при обработке олигонуклеотидил-(5' → N)-пептида раствором NaOH в смеси диоксан – вода.

Данный подход в том виде, в котором его применяют сейчас, представляет собой комбинацию ступенчатого синтеза пептида с C-конца и последующего наращивания на пептидил-полимере олигонуклеотидной цепи аминофосфитным методом (схема 19). Если в пептиде нет остатков гидроксиаминокислот, то прежде чем перейти к синтезу фрагмента ДНК, необходимо ввести в состав пептидил-полимера гидроксильную группу. Для этого α -аминогруппу ацилируют специальным бифункциональным реагентом, содержащим активированную карбоксильную и защищенную гидроксильную группы. Таким образом, между N-концом пептида и олигонуклеотидом появляется специальное мостиковое звено.

Схема 19



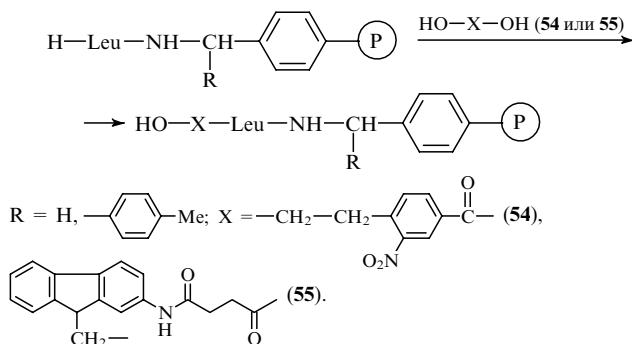
а. Полимерный носитель

Для успешного проведения твердофазного синтеза большое значение имеет правильный выбор полимерного носителя. Наиболее распространенным носителем является пористое стекло CPG.^{95–102} Обычно используют CPG с размером пор, равным 500 Å. В работе¹⁰⁰ описано также получение олигонуклеотидопептидов на силикагеле марки Fractosil. Однако те же авторы в более поздней публикации¹⁰² вынуждены были констатировать, что использование CPG является предпочтительным, так как этот полимерный носитель позволяет получать целевой продукт с более высоким выходом даже при меньшей удельной загрузке первым мономерным звеном. В то же время ряд исследователей (см., например, работы^{103–105}) ставят под сомнение целесообразность применения CPG, так как при синтезе пептидного фрагмента на этом носителе кроме целевого олигомера образуются продукты с меньшей длиной цепи. Авторы работ^{53, 103} считают, что избежать образования коротких пептидных цепей можно, используя сополимер полиэтиленгликоля с полистиролом (PEG-PS). В серии публикаций испанских ученых^{104–113} предложено использовать сополимер стирола с 1% дивинилбензола, который хорошо зарекомендовал себя в синтезе пептидов.

б. Введение якорной группировки

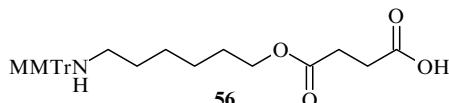
Первый аминокислотный остаток, который в дальнейшем будет C-концевым остатком в синтезируемом пептидном фрагменте, присоединяют к полимеру с помощью сложноэфирной связи. Чтобы осуществить реакцию этерификации между аминокислотой и носителем, последний должен содержать реакционноспособные группировки. Разрабатываются специальные методы химической модификации полимерного носителя.

Испанские исследователи в качестве полимерного носителя использовали полистирол, модифицированный аминометильными^{106–109} или *n*-метилбензигидриламинными^{109, 110} группами. На первом этапе NH₂-группу носителя ацилировали *N*-зашитенным лейцином, используемым в качестве внутреннего стандарта. После удаления аминозащитной группировки лейцил-полимер обрабатывали бифункциональным агентом — 3-нитро-4-(2-гидроксиэтил)бензойной кислотой (**54**)^{106–110, 113} или *N*-(9-гидроксиметилфлуоренил)-амидом янтарной кислоты (**55**).¹⁰⁹

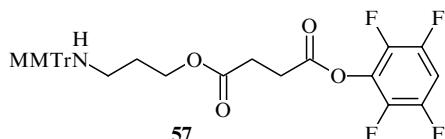


Наличие мостика между носителем и С-концевым аминокислотным остатком позволяет отщеплять конечный продукт от твердой фазы в очень мягких условиях под действием оснований. Мостиковые звенья можно присоединять и непосредственно к носителю, например к PEG-PS, содержащему аминогруппу.^{53, 103}

В публикации⁵³ описано применение в качестве мостика *N*-защищенного 6-аминогексилсукцината **56**.



В работах^{95–97, 100–102} олигонуклеотидопептиды синтезировали с использованием коммерчески доступного CPG, имеющего в своем составе 3-аминопропильные группы. В этом случае химическая модификация полимерного носителя сводилась к ацилированию 3-аминопропильных групп активированными эфирами 4-гидроксимасляной^{95–97} или 10-гидроксидекановой кислоты,^{100–102} в которых гидроксильные группы блокировали с помощью кислотолабильных диметокситритильной и пиксильной ((9-фенил)ксантен-9-ильной) защитных группировок. Австралийские исследователи⁹⁷ дополнительно вводили между остатком 4-гидроксимасляной кислоты и аминопропильным полимером две молекулы ε-аминокапроновой кислоты. Авторы работы⁹⁹ использовали пористое стекло, модифицированное протяженным линкером с концевой NH₂-группой. Последнюю ацилировали активированным эфиром **57**.



Необходимо отметить, что для присоединения первой аминокислоты к полимерному носителю и образования амидной связи в процессе твердофазного синтеза пептидных фрагментов обычно используют карбодиимидный метод, а также методы активированных эфиров и симметричных ангидридов.

в. Защитные группы

Временное блокирование α-аминогрупп аминокислот осуществляют главным образом с помощью Вос-^{53, 99, 101–103, 106–110} или Fmoc-защитной^{95–98, 100} группировки. В процессе последовательного твердофазного синтеза пептидного и олигонуклеотидного фрагментов необходимо также защищать реакционноспособные боковые группы некоторых аминокислотных остатков. Защитные группы выбирают таким образом, чтобы обеспечить возможность

селективного удаления других группировок. Для блокирования ε-аминогруппы лизина чаще всего применяют Fmoc-^{53, 101, 103, 104} или Вос-группу,^{95, 96} реже трифторацетильную (Tfa)¹⁰⁴ и 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогексилиден)этильную (Dde)¹⁰⁰ защитные группировки. Последняя сохраняется при отщеплении *N*^α-Fmoc-группы 20%-ным раствором пиридинина в диметилформамиде. Для защиты β-карбоксильной группы аспарагиновой кислоты ее превращают в 9-флуоренилметиловый эфир.^{53, 103, 106, 108} Возможности для блокирования индольного (in) кольца триптофана сравнительно невелики. Одним из вариантов является *N*ⁱⁿ-формильная защита. В публикации¹⁰⁴ особо подчеркивается, что ее применение в синтезе олигонуклеотидопептидов предотвращает образование побочных продуктов. Авторы работы¹⁰⁴ сообщают также, что им удалось получить соединение Вос-Arg(Fmoc)₂-OH, которое можно использовать в твердофазном синтезе пептидной части конъюгата.

Известно,¹¹¹ что незащищенные амидные группы остатков аспарагина или глутамина в пептидных фрагментах конъюгатов могут подвергаться фосфитилированию в процессе последующей элонгации олигонуклеотидной цепи. Вместе с тем сообщается,^{53, 104} что эта побочная реакция протекает в незначительной степени, поэтому нет необходимости в блокировании боковых групп аспарагина и глутамина.

Авторы работ^{106–110} предпочли не защищать гидроксильные функции серина, треонина и тирозина, но блокировали гидроксильную группу гомосерина с помощью диметокситритильной группировки.^{109, 110, 112} В то же время в публикации¹⁰¹ предложено защищать гидроксильную функцию серина с помощью аллилоксикарбонильной группы. Учитывая, что при реализации Fmoc-стратегии твердофазного пептидного синтеза может происходить частичное отщепление данной защитной группировки, авторы предпочли использовать Вос-стратегию.

Несмотря на достаточно большое число различных вариантов блокирования имидазольного (im) цикла гистидина, идеальной защитной группы для него пока не найдено. При получении пептидов, содержащих эту аминокислоту, применяли *N*^{im}-бензилоксиметильную защитную группу, а деблокирование осуществляли с помощью каталитического гидрирования над палладиевой чернью в присутствии 1,4-циклогексадиена. Такая обработка, по мнению французских исследователей,¹⁰² не должна отрицательно сказываться на устойчивости олигонуклеотидного фрагмента конъюгата. Однако этот метод нельзя считать удовлетворительным, так как авторы не сумели полностью удалить полученный олигонуклеотидопептид с поверхности катализатора.

Использование Вос- или Fmoc-группировки для защиты имидазольного цикла гистидина также нельзя признать вполне удобным. Это связано с тем, что обработка олигонуклеотидопептида трифторуксусной кислотой, необходимая для удаления *N*^{im}-Вос-группы, может привести к гидролизу N-гликозидных связей в пуриновых нуклеотидах, а *N*^{im}-Fmoc-группа достаточно лабильна в процессе твердофазного синтеза. Французские исследователи¹⁰² считают, что для защиты имидазольного кольца гистидина вполне подходит тозильная (Tos) группировка. Ее удаление происходит под действием 1-гидроксибензотриазола, обычно добавляемого в реакционную смесь для подавления рацемизации при образовании пептидной связи с помощью DCC. Авторы другой публикации¹¹⁰ предложили два способа блокирования имидазольного цикла гистидина — с помощью тозильной и 2,4-динитрофенильной групп. Они также считают, что 1-гидроксибензотриазол можно заменить на тетразол, оказавшийся достаточно эффективным реагентом в сочетании с DCC. Анализируя полученные с помощью

Схема 20



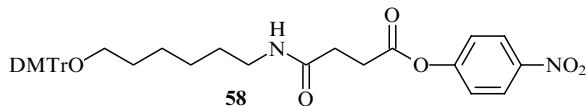
$Y = Ac, Pac; X = -CH_2-, -CH_2C_6H_4-, -CH_2CH_2-, -CH(CH_3)-; R^1, R^2$ — боковые цепи аминокислот.

обращенно-фазовой ВЭЖХ данные, авторы сделали вывод, что использование Boc-His(Tos)-OH с последующим деблокированием имидазольного кольца непосредственно перед началом элонгации олигонуклеотидной цепи является наилучшим вариантом в твердофазном синтезе пептидного фрагмента.

г. Введение мостикового звена

Если после завершения твердофазного синтеза пептидной части[‡] конъюгата в ее составе имеется остаток одной из гидроксиаминокислот, то сначала осуществляют деблокирование α -аминогруппы, а затем проводят повторную избирательную защиту ее фенилацетильной (Pac)^{106–108, 113} либо ацетильной (Ac) группировкой,^{109, 110} после чего приступают к олигонуклеотидному синтезу (схема 20).

Если же в составе пептидной части конъюгата нет остатка гидроксиаминокислоты, то после удаления защитной группировки свободную α -аминофункцию ацилируют соединением, имеющим в своем составе активированную карбоксильную и блокированную гидроксильную группы.^{53, 95–103} В качестве таких ацилирующих соединений используют *n*-нитрофениловый эфир *O*-пиксил-4-гидроксимасляной кислоты,^{97, 99} *n*-нитрофениловый^{100, 101} и пентафторфениловый¹⁰² эфиры *O*-диметокситритил-10-гидроксидекановой кислоты, а также соединение 58.^{53, 95, 96, 103}



Включение алифатической OH-группы в пептид и ее дальнейшее селективное деблокирование позволяет начать синтез ДНК-фрагмента.

д. Синтез олигонуклеотидного фрагмента

В работах^{95–102}, авторы которых использовали в качестве полимерного носителя CPG, автоматический твердофазный амилофосфитный синтез олигонуклеотидной части конъюгата проводили по стандартному регламенту. В то же время те исследователи, которые в качестве полимерного носителя применяли сополимер стирола с этиленгликolem^{53, 103} или сополимер стирола с 1% дивинилбензола,^{106–113} были вынуждены модифицировать стандартные методики с целью повышения выхода на каждой стадии олигонуклеотидного синтеза. К таким модификациям следует отнести увеличение в несколько раз времени проведения всех основных стадий цикла образования межнуклеотидной связи,

использование 5-(2-нитрофенил)тетразола вместо тетразола и значительное повышение концентрации раствора нуклеотидного компонента в дихлорметане.

В подавляющем большинстве работ наращивание олигомерной цепи осуществляли в направлении $3' \rightarrow 5'$ за исключением тех случаев, когда в качестве мономерных компонентов были использованы 5'-амилофосфиты защищенных дезоксинуклеозидов.^{106–108} Наряду с ацильными защитными группировками для блокирования эзоциклических аминогрупп гетероциклических оснований использовали лабильные защиты.^{106, 108, 109, 113} Например, для блокирования NH₂-групп аденина и гуанина применяли *N,N*-диметилформамидиновую и *tert*-бутилфеноксиацетильную группы, а для цитозина — изобутирильную и *tert*-бутилфеноксиацетильную группы.

е. Отщепление олигонуклеотидопептидов от полимерного носителя и деблокирование функциональных групп

Проблема, которую необходимо решить для успешного проведения твердофазного синтеза олигонуклеотидопептидов путем последовательного постадийного наращивания пептидной и олигонуклеотидной цепей, состоит в определении оптимальных условий деблокирования функциональных групп и расщепления связи между конъюгатом и полимерным носителем. Так, например, ввиду опасности частичной апуринизации ДНК не рекомендуется отщеплять олигонуклеотидопептид от полимера действием сильных кислот, а также использовать кислотолабильные защитные группировки. По этой причине в большинстве обсуждаемых статей постсинтетические обработки проводили в мягких условиях с помощью оснований. Опасения, что основания приведут к рацемизации при α -углеродном атоме в аминокислотных остатках, не подтвердились.⁵³ Отмечалось также, что щелочная обработка конъюгатов, в которых пептид присоединен к олигонуклеотиду через сериновый остаток, способствует расщеплению фосфордиэфирной связи между двумя фрагментами.^{3, 4} Реакция включает разрыв связи C—O и протекает как β -элиминирование, катализируемое основаниями (см. схему 2). Однако после тщательного изучения этого вопроса было показано,¹⁰⁸ что обработка конъюгатов смесью концентрированного водного аммиака и диоксана (1:1) при комнатной температуре в течение 15–24 ч не приводит к разрыву связи между олигонуклеотидным фрагментом и остатком серина.

Испанские авторы^{106–109} предложили удобный метод отделения олигонуклеотидопептидов от твердой фазы под действием 0.05 М раствора фторида тетрабутиламмония в тетрагидрофуране. Реакция протекает при комнатной температуре в течение 30–60 мин. Такая обработка обеспечивает также удаление β -цианэтильных групп, блокирующих межнуклеотидные фосфаты, и расщепление 9-флуоренилметилового эфира аспарагиновой кислоты. Далее осуществляют деблокирование эзоциклических аминогрупп гетероциклических оснований под действием смеси концентрированного

[‡] Для встраивания гомосерина в пептидную цепь *N*^z-Pac-*O*-DMTr-Hse вводят в конценсацию в виде триэтиламмониевой соли.^{109, 110}

водного аммиака и диоксана (1 : 1) при комнатной температуре в течение 15–18 ч. В работе¹¹⁰ данную операцию проводили при 55°C. По-видимому, более жесткие условия были необходимы для удаления изобутирильной защиты, блокировавшей экзоциклическую аминогруппу гуанинового основания в ДНК-фрагменте. Таким же путем удаляют некоторые другие защитные группы — тозильную и 2,4-динитрофенильную (у гистидина).

Однако попытка авторов работы⁵³ отделить олигонуклеотидопептид от полимерного носителя (PEG-PS) с помощью фторида тетрабутиламмония не удалась. Было высказано предположение, что входящий в состав носителя полиэтиленгликоль препятствует протеканию реакции β-элиминирования, катализируемой фторид-ионом. Использование фторида тетрабутиламмония неприемлемо и для отщепления от полимера олигонуклеотидопептидов, у которых в образовании связи между фрагментами конъюгата принимает участие гидроксильная группа остатка тирозина. В данном случае две части гибридной молекулы связаны фосфотриэфирной связью. Следовательно, весьма вероятно, что при нуклеофильной атаке фторид-иона на атом фосфора будет происходить разрыв связи Р—O с образованием достаточно устойчивого феноксид-иона. Поэтому в публикации¹⁰⁹ для снятия олигонуклеотидопептида с полимерного носителя было предложено использовать смесь концентрированного водного аммиака и диоксана (1 : 1). Реакцию проводили при 55°C в течение 18 ч. Необходимо отметить, что в этих условиях карбоксильная функция C-концевого остатка аминокислоты превращается в амидную.

В публикациях^{53, 96} отмечается, что применение концентрированного водного аммиака для отщепления олигонуклеотидопептидов от полимерного носителя и удаления защитных группировок приводит к образованию смеси продуктов. Этот факт можно объяснить тем, что разрыв сложноэфирной связи под действием концентрированного аммиака происходит с образованием как амида, так и аммониевой соли. В работе⁵³ перед аммонолизом олигонуклеотидопептидил-полимер обрабатывали 0.5 М раствором 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ена (DBU) в ацетонитриле. Таким образом удаляли N^ε-Fmoc- и β-цианэтильные группировки и расщепляли 9-флуоренилметиловый эфир аспарагиновой кислоты. Авторы считают, что такая последовательность

стадий позволяет исключить превращение сложного эфира в амид.

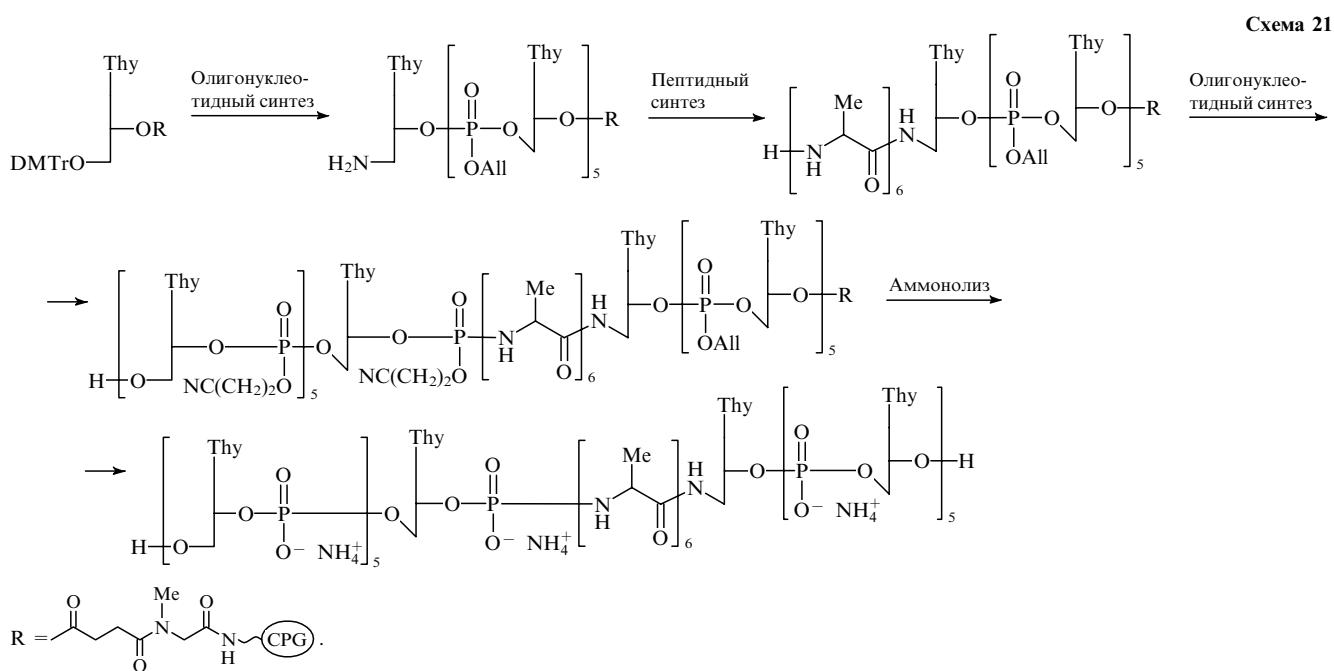
Французские исследователи¹⁰⁰ для отщепления защищенного олигонуклеотидопептида от полимерного носителя использовали 50%-ный раствор этаноламина в абсолютном этиловом спирте (60°C, 30 ч). Конечный продукт был получен ими в виде моноэтаноламида с очень низким выходом. Для увеличения выхода авторы работ^{101, 102} решили использовать 0.1 М NaOH вместо этаноламина. В этих условиях гидролиз сложноэфирной связи между олигонуклеотидопептидом и полимерным носителем происходит за 2 ч при комнатной температуре, одновременно происходит удаление ряда других защитных группировок — β-цианэтильных (у межнуклеотидных фосфатов), тозильной (у гистидина), аллилоксикарбонильной (у серина), Fmoc- или Dde-групп (у лизина). Авторы отмечают, что для деблокирования экзоциклических аминогрупп аденина, цитозина и гуанина требуется не менее 24 ч.

Использование Вос-защиты для блокирования боковой аминогруппы лизина нежелательно, так как ее удаление протекает в достаточно жестких условиях (под действием трифтормуксусной кислоты и 1,2-этандитиола (9 : 1) в течение 5 мин^{95, 96}), что может привести к гидролизу N-гликозидных связей в олигонуклеотидном фрагменте и последующей деструкции целевого продукта.

2. Последовательный синтез олигонуклеотидного и пептидного фрагментов на одном полимерном носителе

В рассмотренных выше работах олигонуклеотидопептиды получали ступенчатым методом: сначала на твердой фазе синтезировали пептидную часть гибридной молекулы, после чего переходили к наращиванию олигонуклеотидной цепи. Однако возможен и альтернативный вариант, когда первым получают ДНК-фрагмент. Ограничением такого подхода в силу изложенных ранее причин является невозможность использования в пептидном синтезе Вос-стратегии.

В работах^{114–117} описан твердофазный синтез олигонуклеотидов, содержащих на 5'-конце реакционноспособную NH₂-группу. Для этого в олигомерную цепь на последней стадии автоматического амидофосфитного синтеза вводили остаток 5'-амино-5'-дезокситимидина (схема 21). Модифици-



рованный таким образом нуклеозид выступал в роли мостикового звена между олигонуклеотидным и пептидным фрагментами конъюгата. В работе¹¹⁴ для наращивания пептидной цепи использовали Fmoc-стратегию, причем активацию карбоксильной группы проводили *in situ* при помощи гексафторфосфата *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилурония (HBTU). В качестве фосфатблокирующей группировки была выбрана аллильная, а не обычно применяемая β -цианэтильная, так как для удаления Fmoc-группы авторы использовали достаточно сильное органическое основание — DBU (вместо пиридинина). По этой же причине твердофазный синтез вели на модифицированном CPG. Чтобы связь между олигонуклеотидом и полимером была устойчива при обработке DBU, в якорную группу включали остаток саркоэмина.

После завершения синтеза пептидного фрагмента еще раз проводили наращивание олигонуклеотидной цепи. В этом случае для синтеза второго олигонуклеотидного фрагмента использовали 2-цианэтил-*N,N*-дизопропиламидофосфиты 2'-дезоксинуклеозидов. Таким образом получали конъюгаты, состоящие из двух фрагментов ДНК, соединенных между собой пептидным фрагментом. Их отделяли от полимерного носителя последовательной обработкой сначала Pd[PPh₃]₄ и морфолином в смеси ДМСО — ТГФ — диоксан — 0.5 М HCl (2:2:2:1) при 60°C в течение 3 ч, а затем 30%-ным водным аммиаком при комнатной температуре в течение 2 ч. Следует отметить, что связь между пептидом и вторым олигонуклеотидом является фосфамидной. Она не разрушается при постсинтетическом деблокировании олигонуклеотидопептида и его отделении от полимерного носителя.

Американские исследователи^{115, 116} разработали аналогичную схему синтеза конъюгатов, в которых олигонуклеотидным фрагментом является гетерополимер.

Заслуживает особого упоминания, на наш взгляд, одно из последних исследований тех же авторов.¹¹⁷ Ими предложена методология получения циклических олигонуклеотидопептидных конъюгатов. В качестве исходных соединений они использовали Fmoc-защищенные аминокислоты и All-защищенные амидофосфиты нуклеозидов. Таким путем был получен циклический гибрид Glu-Leu-T*T-DP-Lys (**59**) (T* — 5'-амино-5'-дезокситимидин, DP — 3-гидрокси-2,2-диметилпропионовая кислота). В образовании амидной связи типа «голова — хвост» участвовали ϵ -аминогруппа лизина и ω -карбоксильная группа остатка глутаминовой кислоты. Строение соединения **59** было подтверждено методами спектроскопии ЯМР ¹H и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Циклический конъюгат оказался устойчивым к экзо- и эндо-нуклеазам. Варьируя пептидный фрагмент, удалось получить аналогичный 39-членный цикл.

3. Синтез олигонуклеотидопептидов на полимерных носителях с бифункциональной разветвленной якорной группой

Значительный интерес представляет метод получения олигонуклеотидопептидов, разработанный в начале 1990-х годов^{118—121} и успешно развитый в работах последних трех лет.^{122—125} Авторы этих работ предложили использовать для синтеза олигонуклеотидопептидов полимерный носитель с разветвленной якорной группой, имеющей в своем составе OH- и NH₂-функции. Наличие такой группы позволяет проводить последовательное наращивание мономерных звеньев сначала одного типа, а затем другого на одном и том же носителе. После постсинтетических обработок получают гибридную молекулу, в которой олигонуклеотидный и пептидный фрагменты связаны между собой линкером. Отличительной чертой данного метода является то, что бифункцио-

нальное[§] мостиковое звено присоединяют непосредственно к твердой фазе, а не к одному из фрагментов синтезируемого конъюгата. В качестве мостикового звена могут использоваться 3-аминопропан-1,2-диол¹¹⁸ и 6-амино-2-гидроксиметилгексан-1-ол.¹¹⁹ Гидроксильную и аминофункции блокируют с помощью широко применяемых DMTr- и Fmoc-группировок соответственно.

В работах^{118, 119} сначала синтезировали пептидный фрагмент. Во время пептидного синтеза ϵ -аминофункцию лизина защищали с помощью Вос-группы, гидроксильную группу серина и тиольную группу цистеина — *tert*-бутилдиметилсilyльной (TBDMS) и тритильной (Tr) группировками соответственно, аминофункции аденина и гуанина — 2-(ацетоксимилил)бензоильной, а цитозина — ацетильной группой.

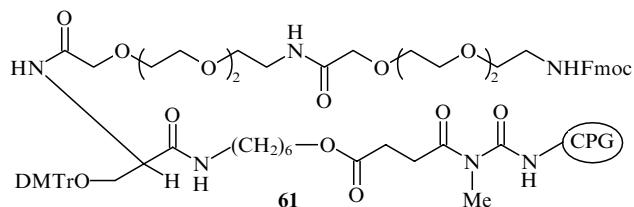
Основное различие в подходах, предложенных канадскими¹¹⁸ и американскими¹¹⁹ исследователями, заключается в выборе нерастворимого носителя и способе его химической модификации.

Канадские исследователи¹¹⁸ в качестве полимера использовали коммерчески доступный тефлон, к которому с помощью протяженного линкера присоединяли остаток 5'-*O*-диметокситритил-2',3'-ди-*O*-ацетиладенозина. На первой стадии избирательно снимали DMTr-защиту с 5'-гидроксильной группы и вводили остаток защищенного 3-аминопропан-1,2-диола с использованием амидофосфитной стратегии. Полученное таким путем соединение **60** использовали в дальнейшем для наращивания пептидной и олигонуклеотидной цепей (схема 22). Сначала проводили пептидный, а затем олигонуклеотидный синтез. После окончания синтеза пептидной и олигонуклеотидной частей конъюгата осуществляли деблокирование функциональных групп в мягких условиях под действием этилендиамина в абсолютном этиловом спирте (1:1) при 55°C в течение 1 ч. (Такая процедура снятия защитных групп была специально разработана при получении метилфосфонатных производных олигонуклеотидов.) Отщепление целевого продукта от твердой фазы осуществляли в две стадии. Сначала окисляли *cis*-гликольную группировку мостикового 2',3'-ди-*O*-ацетиладенозина периодатом натрия, после чего осуществляли β -элиминирование олигонуклеотидопептида (разрыв связи C(5') — O) под действием PrNH₂.

Американские исследователи¹¹⁹ использовали в качестве носителя модифицированный линкером сополимер стирола с этиленгликолем (схема 23).

Для постсинтетического деблокирования функциональных групп в целевом продукте применяли мягкие основные условия (0.05 М K₂CO₃ в метаноле). Авторы отмечают, что для окончательного расщепления связи между олигонуклеотидопептидом и полимером потребовалась дополнительная обработка аммиаком при комнатной температуре в течение 30 мин.

В работе¹²¹ сообщается об успешном применении для синтеза олигонуклеотидопептидов полимера **61** с разветвленным линкером.



[§] Отметим, что более корректно говорить о три-, а не о бифункциональном реагенте, так как в нем присутствует еще одна реакционноспособная группа, участвующая в образовании ковалентной связи с полимерным носителем.

Схема 22

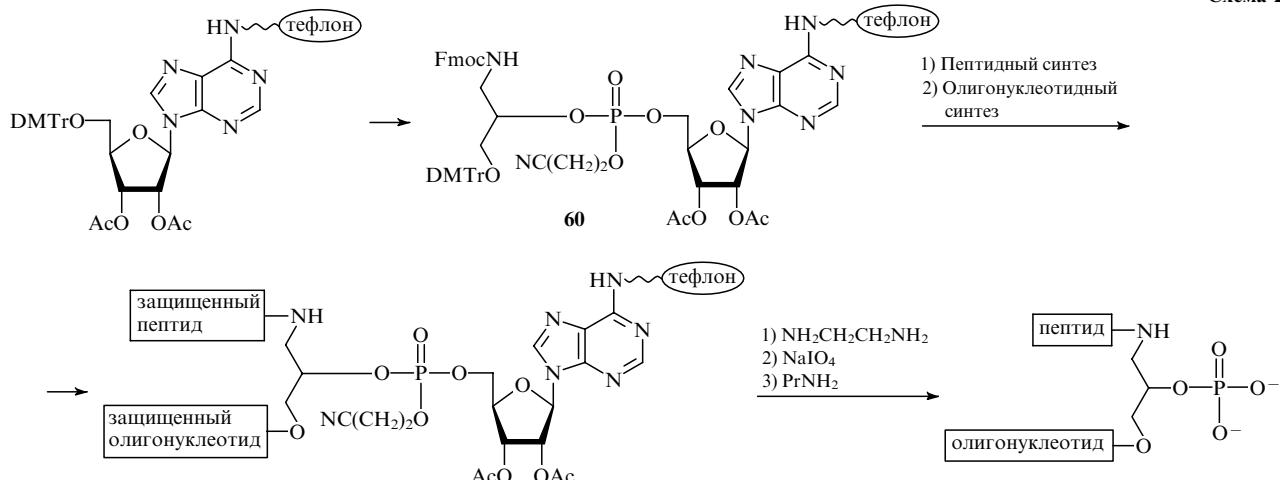
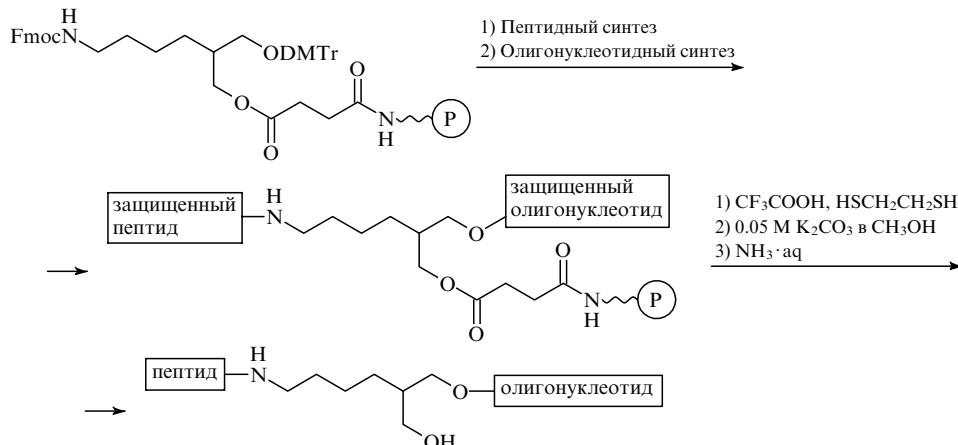
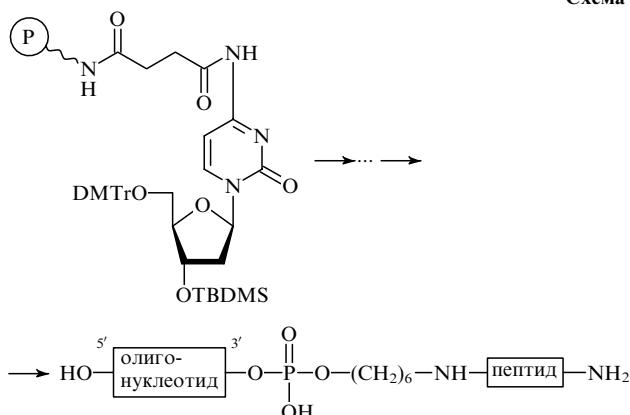


Схема 23

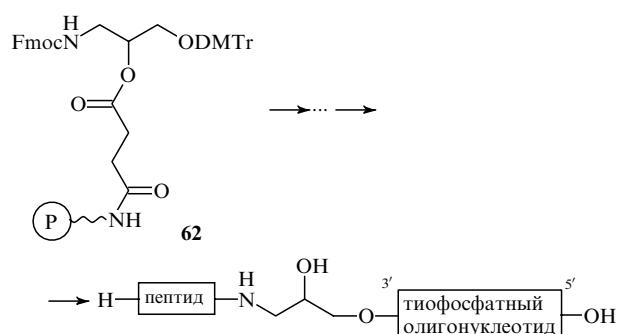


Авторы публикации¹²² использовали для модификации полимерного носителя остаток нуклеозида, содержащий в качестве гетероциклического основания цитозин. Этот остаток присоединяли к спейсерной группе полимерного носителя через экзоциклическую аминогруппу цитозина (схема 24). Предварительно защищенные 3'- и 5'-гидроксильные группы дезоксирибонуклеозидного остатка в таком полимерном носителе затем модифицировали амидофосфитными производными: 5'-гидроксильную группу применяли для традиционного наращивания олигонуклеотидной цепи в направлении 3' → 5', а 3'-гидроксильную группу фосфитилировали коммерчески доступным стандартным аминолинкером и затем использовали в пептидном синтезе.

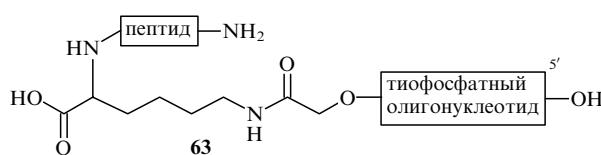
Схема 24



В работах^{123, 124} описаны дизайн, синтез и тестирование нового полимерного носителя **62** для получения олигопептидопептидов, а также их тиофосфатных аналогов. Деблокированная гидроксильная группа в таком носителе участвует в осуществлении стандартного олигонуклеотидного синтеза, а деблокированная аминогруппа — в пептидном синтезе. В результате 3'-конец олигонуклеотида оказывается присоединен к С-концу пептида через фосфодиэфирную (или тиофосфодиэфирную) связь и короткий линкерный мостик.



Позже теми же авторами¹²⁵ был осуществлен синтез олигопептидопептида **63** с использованием полимерного носителя с разветвленным линкером.



4. Синтез олигонуклеотидопептидов методом фрагментной конденсации

Суть данного метода состоит в том, что образование ковалентной связи между заранее синтезированным пептидом и олигонуклеотидом происходит после завершения автоматического олигонуклеотидного синтеза, но до отщепления фрагмента нуклеиновой кислоты от полимерного носителя. Основным преимуществом данного подхода можно считать то, что один компонент конъюгата не подвергается действию химических реагентов, используемых для получения другого компонента, как это бывает при последовательном твердофазном синтезе олигонуклеотидопептидов.

Достаточно часто для получения конъюгатов используют реакцию между иммобилизованным на нерастворимом носителе олигонуклеотидом со свободной 5'-гидроксильной функцией и амилофосфитным производным пептида в присутствии тетразола.^{108, 111, 126–133} Амилофосфитные производные пептидов могут быть получены с хорошим выходом при взаимодействии гидроксильной группы остатка серина или тирозина с одним из стандартных фосфитилирующих агентов.^{108, 126–132} Испанские исследователи^{111, 133} предложили фосфитилировать С-концевую амидную группу пептида.

Как и при разработке других методов синтеза олигонуклеотидопептидов, основные усилия исследователей были направлены на определение наиболее мягких условий проведения постсинтетических обработок. Это особенно важно в тех случаях, когда в образовании фосфодиэфирной связи между олигонуклеотидным и пептидным фрагментами конъюгата участвует остаток серина. Такие соединения могут разрушаться в щелочных условиях. Напротив, молекулы, содержащие фосфамидную связь, неустойчивы в сильнокислой среде.

В работе¹²⁸ α -аминогруппу пептида блокировали *n*-нитробензилокарбонильной защитой, а ω -карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот превращали в *n*-нитробензиловые эфиры. Эти защитные группировки одновременно удаляются смесью дитионита и бикарбоната натрия. Экзоциклические аминогруппы гетероциклов блокировали с помощью 2-(*трет*-бутилдифенилсилилоксиметил)-бензоильной защиты. В рассматриваемой работе¹²⁸ для присоединения первого нуклеозида к полимеру использовали остаток щавелевой кислоты. Отделение конечного продукта от твердой фазы с одновременным деблокированием гетероциклических оснований и межнуклеотидных фосфатов проводили фторидом тетрабутиламмония в смеси пиридина – вода.

Известно, что аллилоксикарбонильная и аллильная защитные группировки отщепляются в мягких условиях. С их помощью в работах^{129–131} блокировали функциональные группы олигонуклеотидного (экзоциклические аминогруппы гетероциклических оснований, межнуклеотидные фосфаты) и пептидного (концевые NH₂- и COOH-группы) фрагментов. Эти группы легко удаляются смесью комплекса палладия и формиата диэтиламмония.

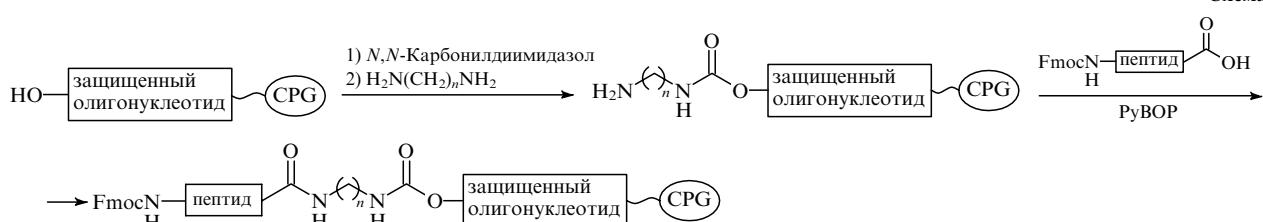
Испанские исследователи¹⁰⁸ в синтезе олигонуклеотидопептидов, имеющих в своем составе фрагмент нуклеотидил-(5' → O)-серина, использовали сложноэфирную защиту для боковой карбоксильной группы аспарагиновой кислоты. Для этой цели применяли один из трех сложных эфиров: 9-флуоренилметиловый, бензиловый или 2-(2-нитро-4-ацетилфенил)этиловый. Экзоциклические аминогруппы остатков аденина блокировали с помощью бензоильной либо *N,N*-диметилформамидиновой группы. Отщепление олигонуклеотидопептида от полимерного носителя и удаление защитных группировок осуществляли тремя разными способами: концентрированным водным раствором аммиака, раствором карбоната калия или гидроксида лития в смеси метанол – диоксан. Отметим, что авторам работы¹⁰⁸ не удалось корректно охарактеризовать полученный ими продукт и подтвердить его строение данными масс-спектрометрии и аминокислотного анализа.

Методы получения конъюгатов с амидной связью между олигонуклеотидной и пептидной частями были рассмотрены нами в разделе II.3, посвященном синтезу олигонуклеотидопептидов в растворе. Отмеченные в публикациях^{38, 39} трудности удалось в значительной степени преодолеть, проводя конденсацию олигонуклеотидного и пептидного фрагментов на твердой фазе, что привело к существенному увеличению выхода конечного продукта. В работе³⁹ разложение диазокетона 37 (см. схему 10) вели в присутствии бензоата серебра, а не при УФ-облучении, из-за опасения, что в последнем случае скорость реакции снизится, так как полимерный носитель (полистирол или CPG) будет поглощать часть энергии.

Американские исследователи¹¹⁵ осуществили конденсацию пентапептида Ac-Ala-Tyr-Gln-Val-Phe и иммобилизованных на твердой фазе три- и тетрануклеотидов, содержащих на 5'-конце остаток 5'-амино-5'-дезокситимидина. Однако они отмечают низкую эффективность реакции, объясняя это плохой растворимостью пептида в диметилформамиде.

Следует особо остановиться на опубликованных недавно работах^{134, 135}. Для включения в состав ДНК-фрагмента алифатической аминогруппы Гейт и сотр.^{134, 135} применили следующий подход: после удаления концевой DMTr-группы свободную 5'-гидроксильную группу олигонуклеотидил-полимера активировали с помощью *N,N*-карбонилдиimidазола, а затем ввели в реакцию с диамином (схема 25). При использовании в качестве конденсирующего агента PyBOP в присутствии 1-гидроксибензотриазола степень рацемизации при α -углеродном атоме в С-концевом аминокислотном остатке очень невелика. Тем не менее для конъюгации с олигонуклеотидами авторами были выбраны пептиды с

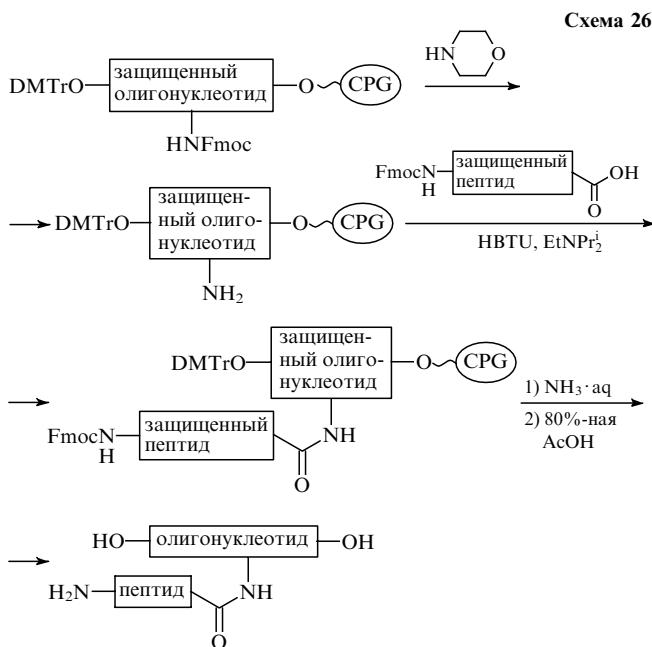
Схема 25



C-концевым глицином, так как в этом случае α -карбоксильную группу пептидов можно активировать, не опасаясь рацемизации. В качестве пептидных фрагментов авторы использовали тетрапептид, состоящий из остатков неполярных аминокислот, и октапептид, построенный из полярных аминокислотных остатков, а в качестве олигонуклеотидов — различные гомо- (например, T₁₂) и гетероолигонуклеотиды. Анализируя приведенные в статьях^{134, 135} данные, можно сделать вывод о том, что конъюгация обоих пептидов с T₁₂ протекает достаточно эффективно. В то же время выходы олигонуклеотидопептидов, полученных в результате конденсации этих пептидов с гетероолигонуклеотидами, оказались очень низкими. Причину этого авторы объяснить не смогли. Варьирование условий — использование вместо CPG другого полимерного носителя (PEG-PS), увеличение избытка пептида с 5 до 10 эквивалентов, проведение реакции при повышенной температуре (40°C) — не дало положительных результатов.

Было высказано предположение, что основная проблема связана с плохой растворимостью защищенных гетероолигонуклеотидов в диметилформамиде по причине их большой гидрофобности. С целью преодоления этой трудности β -цианэтильные защитные группы были избирательно удалены под действием триэтиламина в ацетонитриле. Это привело к некоторому увеличению выходов конечных продуктов. В большинстве случаев удлинение линкера, содержащего аминогруппу, также положительно сказывалось на выходе конъюгатов.

В работе¹³⁶ для конденсации предварительно синтезированного пептида и блокированного олигонуклеотида, иммобилизованного на твердофазном носителе и содержащего линкер, присоединенный к C(2')-атому углеводного фрагмента, была применена новая разновидность этой реакции (схема 26). В качестве олигонуклеотидного фрагмента авторы использовали олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие в своем составе остаток одного из трех модифицированных нуклеозидов: 2'-*(3*-аминопропионил)амино-2'-дезоксиарбиноаденозин, 2'-*(3*-аминопропионил)амино-2'-дезоксиуридин или 2'-амино-2'-дезоксиарбиноаденозин.



Сначала избирательно деблокировали Fmoc-защищенную аминогруппу, присоединенную либо непосредственно, либо с помощью линкера к C(2')-атому углеводного фраг-

мента одного из нуклеотидных остатков под действием 50%-ного раствора морфолина в диметилформамиде в течение 1 ч. Затем вводили олигонуклеотид со свободной NH₂-группой в реакцию с защищенным пептидным фрагментом.

В качестве пептидного фрагмента были выбраны два коротких пептида N^α-Fmoc-Leu-Gly и N^α-Fmoc-Tyr-D-Ala-Phe-Gly. В обоих случаях C-концевым аминокислотным остатком являлся остаток глицина. Последнее обстоятельство является важным, так как в этом случае при активации карбоксильной группы пептидов не возникало опасности рацемизации из-за отсутствия в молекуле глицина асимметрического атома углерода.

Реакцию между N^α-блокированным пептидом и олигодезоксирибонуклеотидом, иммобилизованным на CPG-500, проводили в абсолютном диметилформамиде в присутствии HBTU и дизопропилэтиламина (DIPEA). Реакция протекала за 1–2 ч с высоким выходом (80–90%). На завершающем этапе конъюгат отделяли от полимерного носителя и деблокировали функциональные группы олигонуклеотидного и пептидного компонентов.

Использование твердофазного метода требует применения больших избытков пептидов и конденсирующего агента. Это повышает эффективность образования амидной связи, а избытки хорошо растворимых в диметилформамиде реагентов легко удаляются щадительной промывкой полимерного носителя.

Основное преимущество при использовании Fmoc-защиты для аминогруппы состоит в том, что ее можно удалить двумя способами. Первый предполагает постсинтетическую обработку олигонуклеотида насыщенным водным раствором амиака. Другой способ заключается в удалении Fmoc-группы морфолином в абсолютной среде, что позволяет избирательно деблокировать алифатическую аминогруппу в составе олигонуклеотида. В данных условиях олигонуклеотид не отщепляется от полимерного носителя, а все остальные его функциональные группы остаются блокированными.

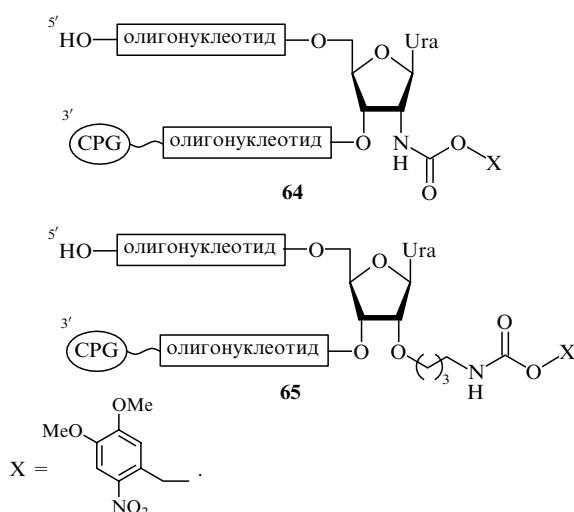
Предложенный в работе¹³⁶ подход позволяет присоединять к олигонуклеотиду сразу несколько пептидных фрагментов, так как модифицированное нуклеозидное звено, содержащее алифатическую аминогруппу, может быть встроено в любое заранее определенное положение олигомерной цепи, а само количество вставок в принципе не ограничено. Серьезным преимуществом является также то, что 5'- и 3'-концы олигонуклеотидного фрагмента конъюгата остаются свободными. Это обстоятельство позволяет присоединять к ним различные репортерные группы, например радиоактивные или флуоресцентные метки.

Определенные трудности могут возникнуть при использовании этого метода для синтеза конъюгатов олигонуклеотидов с более длинными пептидами, так как в этом случае достаточно трудно активировать карбоксильную группу. Кроме того, данный метод требует применения больших избытков пептидов, что вряд ли можно считать оправданным с экономической точки зрения.

В качестве альтернативного варианта можно использовать подход, предполагающий последовательное присоединение к олигонуклеотиду небольших пептидных фрагментов. После того как первый фрагмент уже присоединен, необходимо удалить N^α-Fmoc-группу и затем вводить в реакцию следующий фрагмент. Таким образом, используя N^α-Fmoc-Leu-Gly и N^α-Fmoc-Tyr-D-Ala-Phe-Gly, удалось синтезировать конъюгаты олигодезоксирибонуклеотидов с пептидами, содержащими четыре и восемь аминокислотных остатков.

Подобная идеология нашла отражение в работах Хванга и Гринберга,^{137, 138} которые в процессе автоматического синтеза олигонуклеотидов включали в различные положения цепи 2'-модифицированные амидофосфитные синтоны **64** и

65. Аминогруппа при атоме C(2') синтона была блокирована с помощью фотолабильной защитной группы X.



Присоединение трипептидов к модифицированным олигонуклеотидам **64** и **65** приводит к соответствующим конъюгатам с удовлетворительными (70–80%) выходами.

В работе¹³⁹ описан синтез фоторасщепляемых олигонуклеотидопептидных конъюгатов, применяемых для определения целевых НК-последовательностей методом MALDI-спектрометрии (схема 27). В этом случае фоторасщепляемый конъюгат содержит олигонуклеотидный зонд на целевую ДНК- или РНК-последовательность и пептидный масс-маркер, который легко детектируется масс-спектромет-

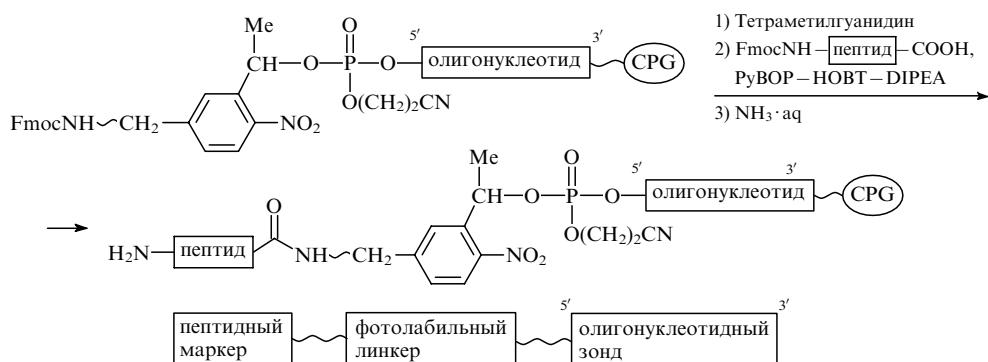
рически после гибридизации и последующего фоторасщепления конъюгата.

Японские ученые^{140, 141} предложили использовать для синтеза олигонуклеотидопептидов специальный полимер с кетоксимными функциональными группами (схема 28). Якорную группировку (линкер) присоединяли к носителю сложноэфирной связью. Использование такого носителя позволяет отщеплять от него конечный продукт под действием различных нуклеофилов. Так, в роли нуклеофила может выступать пептидный фрагмент.

IV. Заключение

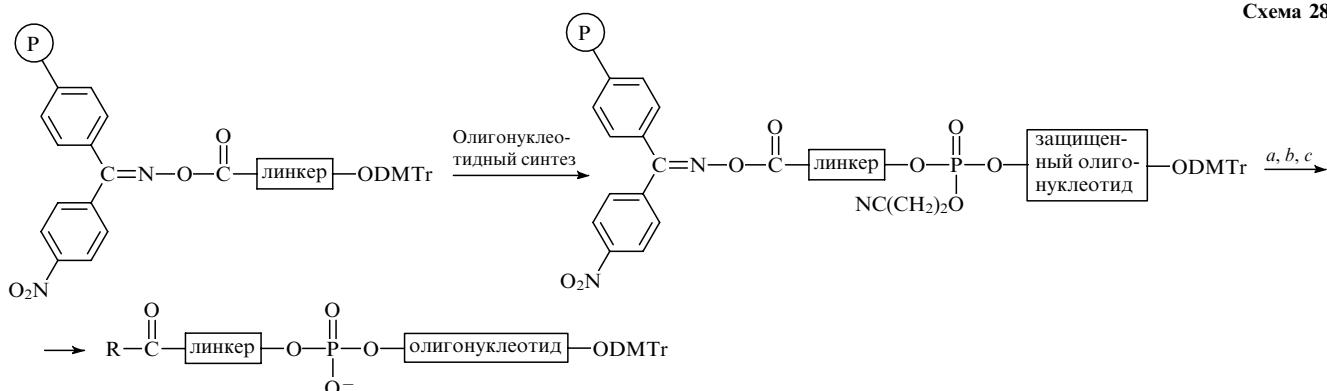
Анализ литературных данных показывает, что к настоящему времени так и не удалось найти универсальный метод, позволяющий синтезировать олигонуклеотидопептиды любого строения. Это связано с тем, что при синтезе олигонуклеотидопептидов решающее значение имеют сразу несколько факторов: тип модифицированного фрагмента нукleinовой кислоты, аминокислотная последовательность и размер пептида, а также способ конъюгации и строение звена, соединяющего две части гибридной молекулы. Возможность варьировать все эти параметры в широких пределах и использовать их различные комбинации привела к появлению большого числа публикаций, посвященных разработке методов получения олигонуклеотидопептидов. Однако из-за серьезных недостатков, присутствующих почти в каждой из предложенных методик, лишь малая часть из них нашла реальное применение в препаративном синтезе конъюгатов олигонуклеотидов с пептидами. В этой связи поиск оптимальных подходов к синтезу олигонуклеотидопептидов продолжает оставаться актуальным.

Схема 27



DIPEA — дизопропилэтамин.

Схема 28



Линкер — $-(\text{CH}_2)_6-$, $-\text{Gly}-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_6-$, $-\text{Gly-Gly-Gly}-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_6-$; a — EtNPrⁱ; b — RH (RH — H-Gly-Gly-Gly-NEt₂ или H-Leu-Ala-Lys(Tfa)-Leu-NEt₂); c — NH₃·aq.

Авторы выражают благодарность А.В.Качаловой за помощь при оформлении настоящего обзора.

Работа выполнена в рамках программ «Ведущие научные школы» (грант 00-15-97944) и «Университеты России» (грант 015.07.02.027) при поддержке гранта Wellcome Trust (грант 057361).

Литература

1. А.А.Богданов. *Успехи совр. биологии*, **55**, 321 (1963)
2. Б.А.Юодка. *Биоорг. химия*, **6**, 1445 (1980)
3. Б.А.Юодка. *Ковалентные нуклеиново-белковые структуры и их химическое моделирование*. Мокслас, Вильнюс, 1985
4. Z.A.Shabarova. In *Progress in Nucleic Acid Researches and Molecular Biology*. (Eds J.N.Davidson, W.E.Cohn). Academic Press, New York, 1970
5. Н.И.Соколова, Г.И.Гурова, З.А.Шабарова, М.А.Прокофьев. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **24**, 104 (1969)
6. В.Д.Смирнов, Т.Н.Бочарова, З.А.Шабарова, М.А.Прокофьев. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **27**, 3 (1972)
7. J.Goodchild. *Bioconjugate Chem.*, **1**, 165 (1990)
8. E.Uhlmann, A.Peyman. *Chem. Rev.*, **90**, 543 (1990)
9. S.L.Beaucage, R.P.Iyer. *Tetrahedron*, **49**, 10441 (1993)
10. M.Manoharan. In *Antisense Research and Applications*. (Eds S.L.Crooke, B.Lebleu). CRC Press, Boca Raton, FL, 1993
11. Д.А.Степенко, А.А.Арзуманов, В.А.Коршун, М.Дж.Гейт. *Молекулар. биология*, **34**, 998 (2000)
12. C.-H.Tung, S.Stein. *Bioconjugate Chem.*, **11**, 605 (2000)
13. Э.Шредер, К.Любке. *Пептиды*. Мир, Москва, 1967
14. J.C.Wang. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 665 (1985)
15. C.Schattenkerk, C.T.J.Wreesmann, M.J.de Graaf, G.A.van der Marel, J.H.van Boom. *Tetrahedron Lett.*, **25**, 5197 (1984)
16. E.Kuyl-Yeheskiely, P.A.M.van der Klein, G.A.Visser, G.A.van der Marel, J.H.van Boom. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **105**, 69 (1986)
17. E.Kuyl-Yeheskiely, C.M.Tromp, A.W.M.Lefebvre, G.A.van der Marel, J.H.van Boom. *Tetrahedron*, **44**, 6515 (1988)
18. E.Kuyl-Yeheskiely, C.M.Dreef-Tromp, A.Geluk, G.A.van der Marel, J.H.van Boom. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 2897 (1989)
19. H.Hotoda, Y.Ueno, M.Sekine, T.Hata. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 2117 (1989)
20. Y.Ueno, R.Saito, T.Hata. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 4451 (1993)
21. З.А.Шабарова, А.А.Богданов. *Химия нуклеиновых кислот и их компонентов*. Химия, Москва, 1978
22. В.Ф.Зарытова, Е.М.Иванова, С.Н.Ярмолюк, И.В.Алексеева. *Биополимеры и клетка*, **4**, 220 (1988)
23. Д.В.Пышный, М.Н.Репкова, С.Г.Лохов, Е.М.Иванова, А.Г.Веньяминова, В.Ф.Зарытова. *Биоорг. химия*, **23**, 497 (1997)
24. A.N.Sinyakov, S.G.Lokhov, I.V.Kutyavin, H.B.Gamper, R.B.Meyer. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 4995 (1995)
25. A.S.Levina, V.G.Metelev, A.S.Cohen, P.C.Zamecnik. *Antisense, Nucl. Acid Drug Dev.*, **6**, 75 (1996)
26. В.Ф.Зарытова. В кн. *Биоорганическая химия. (Итоги науки и техники)*. Рукопись деп. в ВИНИТИ АН СССР, Москва, 1984. С. 85
27. M.G.Ivanovskaya, M.B.Gottih, Z.A.Shabarova. *Nucleosides, Nucleotides*, **6**, 913 (1987)
28. Z.A.Shabarova, M.G.Ivanovskaya, M.B.Gottih. In *Nucleic Acids Chemistry Improved and New Synthetic Procedure. Methods and Techniques*. (Eds L.B.Townsend, R.S.Tipson). Wiley, London, 1991. P. 386
29. М.Б.Готтих, М.Г.Ивановская, Е.А.Скрипкин, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **16**, 514 (1990)
30. Е.А.Таран, М.Г.Ивановская, М.Дж.Гайт, З.А.Шабарова. *Молекулар. биология*, **32**, 832 (1998)
31. S.Kuznetsova, S.Ait-Si-Ali, I.Nagibneva, F.Troalen, J.-P.Le Villain, A.Harel-Bellan, F.Svinarchuk. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 3995 (1999)
32. С.А.Кузнецова, Н.В.Сумбатян, К.Мальви, Ж.-Р.Бертран, А.Арель-Беллан, Г.А.Коршунова, Ф.П.Свинарчук. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **42**, 281 (2001)
33. D.L.McMinn, T.J.Matray, M.M.Greenberg. *J. Org. Chem.*, **62**, 7074 (1997)
34. D.L.McMinn, M.M.Greenberg. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 547 (1999)
35. J.D.Kahl, D.L.McMinn, M.M.Greenberg. *J. Org. Chem.*, **63**, 4870 (1998)
36. J.D.Kahl, M.M.Greenberg. *J. Org. Chem.*, **64**, 507 (1999)
37. O.N.Jensen, S.Kulkarni, J.V.Aldrich, D.F.Barofsky. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3866 (1996)
38. E.A.Lukhtanov, I.V.Kutyavin, H.B.Gamper, R.B.Meyer. *Bioconjugate Chem.*, **6**, 418 (1995)
39. C.Guibourdenche, D.Seebach. *Helv. Chim. Acta*, **80**, 1 (1997)
40. R.K.Bruick, P.E.Dawson, S.B.H.Kent, N.Usman, G.F.Joyce. *Chem. Biol.*, **3**, 49 (1996)
41. D.L.McMinn, M.M.Greenberg. *Tetrahedron*, **52**, 3827 (1996)
42. D.L.McMinn, M.M.Greenberg. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3289 (1998)
43. M.McPherson, M.C.Wright, P.A.Lohse. *Synlett*, **S1**, 978 (1999)
44. P.E.Dawson, T.W.Muir, I.Clark-Lewis, S.B.H.Kent. *Science*, **266**, 776 (1994)
45. D.A.Stetsenko, M.J.Gait. *J. Org. Chem.*, **65**, 4900 (2000)
46. D.A.Stetsenko, M.J.Gait. *Nucleosides, Nucleotides*, **19**, 1751 (2000)
47. N.D.Sinha, R.M.Cook. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 2659 (1988)
48. K.Arar, M.Monsigny, R.Mayer. *Tetrahedron Lett.*, **34**, 8087 (1993)
49. C.Pichon, K.Arar, A.J.Stewart, M.D.Dodon, L.Gazzolo, P.J.Courtois, R.Mayer, M.Monsigny, A.-C.Roche. *Mol. Pharm.*, **51**, 431 (1997)
50. C.Neves, G.Byk, D.Scherman, P.Wils. *FEBS Lett.*, **453**, 41 (1999)
51. R.Eritja, A.Pons, M.Escarceller, E.Giralt, F.Albericio. *Tetrahedron*, **47**, 4113 (1991)
52. B.G.de la Torre, A.M.Avino, M.Escarceller, M.Royo, F.Albericio, R.Eritja. *Nucleosides, Nucleotides*, **12**, 993 (1993)
53. B.G.de la Torre, F.Albericio, E.Saison-Behmoaras, A.Bachi, R.Eritja. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 1005 (1999)
54. D.Gottschling, H.Seliger, G.Tarrason, J.Piulats, R.Eritja. *Bioconjugate Chem.*, **9**, 831 (1998)
55. N.J.Ede, G.W.Tregear, J.Haralambidis. *Bioconjugate Chem.*, **5**, 373 (1994)
56. S.Soukchareun, J.Haralambidis, G.W.Tregear. *Bioconjugate Chem.*, **9**, 466 (1998)
57. J.J.Hangeland, J.T.Lewis, Y.C.Lee, P.O.P.Ts'o. *Bioconjugate Chem.*, **6**, 695 (1995)
58. W.Mier, R.Eritja, A.Mohammed, U.Haberkorn, M.Eisenhut. *Bioconjugate Chem.*, **11**, 855 (2000)
59. C.-H.Tung, M.J.Rudolph, S.Stein. *Bioconjugate Chem.*, **2**, 464 (1991)
60. T.Zhu, Z.Wei, C.-H.Tung, W.A.Dickerhof, J.Breslauer, D.E.Georgopoulos, M.J.Leibowitz, S.Stein. *Antisense Res. Dev.*, **3**, 265 (1993)
61. J.-P.Bongartz, A.-M.Aubertin, P.G.Milhaud, B.Lebleu. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 4681 (1994)
62. J.G.Harrison, S.Balasubramanian. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 3136 (1998)
63. M.A.Zanta, P.Belguise-Valladier, J.-P.Behr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 91 (1999)
64. Z.Wei, C.-H.Tung, T.Zhu, S.Stein. *Bioconjugate Chem.*, **5**, 468 (1994)
65. T.Zhu, C.-H.Tung, K.J.Breslauer, W.A.Dickerhof, S.Stein. *Antisense Res. Dev.*, **3**, 349 (1993)
66. T.Zhu, S.Stein. *Bioconjugate Chem.*, **5**, 312 (1994)
67. S.Stein, T.Zhu. *Methods Enzymol.*, **280**, 51 (1997)
68. M.W.Reed, D.Fraga, D.E.Schwartz, J.Scholler, R.D.Hinrichsen. *Bioconjugate Chem.*, **6**, 101 (1995)
69. K.Arar, A.-M.Aubertin, A.-C.Roche, M.Monsigny, R.Mayer. *Bioconjugate Chem.*, **6**, 573 (1995)
70. L.Meunier, R.Mayer, M.Monsigny, A.-C.Roche. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 2730 (1999)
71. L.Meunier, S.Bourgerie, R.Mayer, A.-C.Roche, M.Monsigny. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 206 (1999)

72. Y.Aubert, S.Bourgerie, L.Meunier, R.Mayer, A.-C.Roche, M.Monsigny, N.T.Thuong, U.Asseline. *Nucl. Acids Res.*, **28**, 818 (2000)
73. Y.Lin, A.Padmapriya, K.M.Morden, S.D.Jayasena. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11044 (1995)
74. M.Antopolksky, E.Azhayeva, U.Tengvall, S.Auriola, I.Jääskeläinen, S.Rönkkö, P.Honkakoski, A.Urtti, H.Lönnberg, A.Azhayev. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 598 (1999)
75. D.R.Corey. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 9373 (1995)
76. E.Vivès, B.Lebleu. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 1183 (1997)
77. G.Sengle, A.Jenne, P.S.Arora, B.Seelig, J.S.Nowick, A.Jaschka, M.Famulok. *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 1317 (2000)
78. Z.Kupihar, Z.Schmel, Z.Kele, B.Penke, L.Kovacs. *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 1241 (2001)
79. T.Ishihara, D.R.Corey. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 141 (1999)
80. T.Ishihara, D.R.Corey. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2012 (1999)
81. A.Astriab-Fisher, D.S.Sergueev, M.Fisher, B.R.Shaw, R.L.Juliano. *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 83 (2000)
82. О.М.Гриценко, Е.С.Громова. Успехи химии, **68** 267 (1999)
83. Б.С.Ермолинский, С.Н.Михайлов. Биоорг. химия, **26**, 483 (2000)
84. B.Bayard, C.Bisbal, B.Lebleu. *Biochemistry*, **25**, 3730 (1986)
85. M.Lemaitre, B.Bayard, B.Lebleu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 648 (1987)
86. M.Lemaitre, C.Bisbal, B.Bayard, B.Lebleu. *Nucleosides, Nucleotides*, **6**, 311 (1987)
87. J.P.Leonetti, B.Rayner, M.Lemaitre, C.Gagnor, P.G.Milhaud, J.-L.Imbach, B.Lebleu. *Gene*, **72**, 323 (1988)
88. G.Degols, J.-P.Leonetti, M.Benkirane, C.Devaux, B.Lebleu. *Antisense Res. Dev.*, **2**, 293 (1992)
89. G.Degols, C.Devaux, B.Lebleu. *Bioconjugate Chem.*, **5**, 8 (1994)
90. M.Manoharan, L.K.Andrade, V.Mohan, S.M.Freier, P.Dan Cook. *Nucleosides, Nucleotides*, **16**, 1741 (1997)
91. D.Forget, D.Boturyn, E.Defrancq, J.Lhomme, P.Dumy. *Chem. Eur. J.*, **7**, 3976 (2001)
92. D.Forget, O.Renaudet, D.Boturyn, E.Defrancq, P.Dumy. *Tetrahedron Lett.*, **42**, 91 (2001)
93. B.Cebon, J.N.Lambert, D.Leung, H.Mackie, K.L.McCluskey, X.Nguyen, C.Tassone. *Aust. J. Chem.*, **53**, 333 (2000)
94. S.Dey, T.L.Sheppard. *Org. Lett.*, **3**, 3983 (2001)
95. J.Haralambidis, L.Duncan, G.W.Tregear. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 5199 (1987)
96. J.Haralambidis, L.Duncan, K.Angus, G.W.Tregear. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 493 (1990)
97. S.Soukchareun, G.W.Tregear, J.Haralambidis. *Bioconjugate Chem.*, **6**, 43 (1995)
98. N.Guzzo-Pernell, G.W.Tregear. *Aust. J. Chem.*, **53**, 699 (2000)
99. E.A.Lukhtanov, I.V.Kutyavin, R.B.Meyer. *Bioconjugate Chem.*, **7**, 564 (1996)
100. J.-C.Truffert, O.Lorthioir, U.Asseline, N.T.Thuong, A.Brack. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 2353 (1994)
101. J.-C.Truffert, U.Asseline, N.T.Thuong, A.Brack. *Protein Peptide Lett.*, **2**, 419 (1995)
102. J.-C.Truffert, U.Asseline, A.Brack, N.T.Thuong. *Tetrahedron*, **52**, 3005 (1996)
103. B.G.de la Torre, A.Aviñó, G.Tarrason, J.Piulats, F.Albericio, R.Eritja. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 2733 (1994)
104. V.Marchan, L.Debethune, M.Beltran, J.Robles, I.Travesset, G.Fabregas, E.Pedroso, A.Grandas. *Nucleosides, Nucleotides*, **18**, 1493 (1999)
105. J.Robles, M.Beltrán, V.Marchán, Y.Pérez, I.Travesset, E.Pedroso, A.Grandas. *Tetrahedron*, **55**, 13251 (1999)
106. J.Robles, E.Pedroso, A.Grandas. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 4449 (1994)
107. J.Robles, E.Pedroso, A.Grandas. *J. Org. Chem.*, **59**, 2482 (1994)
108. J.Robles, E.Pedroso, A.Grandas. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 4151 (1995)
109. J.Robles, M.Maseda, M.Beltran, M.Concernau, E.Pedroso, A.Grandas. *Bioconjugate Chem.*, **8**, 785 (1997)
110. M.Beltrán, E.Pedroso, A.Grandas. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 4115 (1998)
111. J.Robles, E.Pedroso, A.Grandas. *J. Org. Chem.*, **60**, 4856 (1995)
112. M.Beltran, M.Maseda, Y.Perez, J.Robles, E.Pedroso, A.Grandas. *Nucleosides, Nucleotides*, **16**, 1487 (1997)
113. M.Beltran, M.Maseda, J.Robles, E.Pedroso, A.Grandas. *Lett. Peptide Sci.*, **4**, 147 (1997)
114. F.Bergmann, W.Bannwarth. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1839 (1995)
115. C.N.Tetzlaff, I.Schwope, C.F.Bleczinski, J.A.Steinberg, C.Richert. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 4215 (1998)
116. I.Schwope, C.F.Bleczinski, C.Richert. *J. Org. Chem.*, **64**, 4749 (1999)
117. C.F.Bleczinski, C.Richter. *Org. Lett.*, **2**, 1697 (2000)
118. C.D.Juby, C.D.Richardson, R.Brousseau. *Tetrahedron Lett.*, **32**, 879 (1991)
119. S.Basu, E.Wickstrom. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 4943 (1995)
120. T.Y.-K.Chow, C.Juby, R.Brousseau. *Antisense Res. Dev.*, **4**, 81 (1994)
121. J.Nielsen, S.Brenner, K.D.Janda. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9812 (1993)
122. L.De Napoli, A.Messere, D.Montesarchio, G.Piccialli, E.Benedetti, E.Bucci, F.Rossi. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 395 (1999)
123. M.Antopolksky, A.Azhayev. *Helv. Chim. Acta*, **82**, 2130 (1999)
124. M.Antopolksky, A.Azhayev. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 9113 (2000)
125. M.Antopolksky, E.Azhaeva, U.Tengvall, A.Azhayev. *Tetrahedron Lett.*, **43**, 527 (2002)
126. C.M.Dreef-Tromp, E.M.A.van Dam, H.van den Elst, G.A.van der Marel, J.H.van Boom. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 6491 (1990)
127. C.M.Dreef-Tromp, H.van den Elst, J.E.van der Boogaart, G.A.van der Marel, J.H.van Boom. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 2435 (1992)
128. C.M.Dreef-Tromp, J.C.M.van der Maarel, H.van den Elst, G.A.van der Marel, J.H.van Boom. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 4015 (1992)
129. A.Sakakura, Y.Hayakawa, H.Harada, M.Hirose, R.Noyori. *Tetrahedron Lett.*, **40**, 4359 (1999)
130. Y.Hayakawa, A.Sakakura, S.Heidenhain, M.Kataoka. *Collect. Symp. Ser.*, **2**, 105 (1999)
131. A.Sakakura, Y.Hayakawa. *Tetrahedron*, **56**, 4427 (2000)
132. J.Robles, E.Pedroso, A.Grandas. *Tetrahedron Lett.*, **32**, 4389 (1991)
133. A.Grandas, J.Robles, E.Pedroso. *Nucleosides, Nucleotides*, **14**, 825 (1995)
134. S.Peyrottes, B.Mestre, F.Burlina, M.J.Gait. *Tetrahedron*, **54**, 12513 (1998)
135. S.Peyrottes, B.Mestre, F.Burlina, M.J.Gait. *Nucleosides, Nucleotides*, **18**, 1443 (1999)
136. E.M.Zubin, E.A.Romanova, E.M.Volkov, V.N.Tashlitsky, G.A.Korshunova, Z.A.Shabarova, T.S.Oretskaya. *FEBS Lett.*, **456**, 59 (1999)
137. J.-T.Hwang, M.M.Greenberg. *Org. Lett.*, **1**, 2021 (1999)
138. J.-T.Hwang, M.M.Greenberg. *J. Org. Chem.*, **66**, 363 (2001)
139. J.Olejnik, H.-C.Ludemann, E.Krzymanska-Olejnik, S.Berkenkamp, K.J.Rothschild. *Nucl. Acids Res.*, **27**, 4626 (1999)
140. M.Fujii, T.Hasegava, I.Koujima. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **37**, 71 (1997)
141. M.Fujii, T.Hasegava, I.Koujima. *Nucleosides, Nucleotides*, **18**, 1487 (1999)

MODERN APPROACHES TO THE SYNTHESIS OF PEPTIDE-OLIGONUCLEOTIDE CONJUGATES

E.M.Zubin, E.A.Romanova, T.S.Oreetskaya

Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University

A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V.Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, 119992 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)939–3181

Published data on the methods of chemical synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates in solution and on the solid phase are discussed. The known methods are systematised, their advantages and drawbacks are noted. The studies devoted to the synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates in solution are arranged according to the type of chemical bond between the fragments, while in the case of solid-phase synthesis, according to the method of conjugate preparation (either successive growth of the oligonucleotide and peptide chains on a single polymer support or solid-phase condensation of two pre-synthesised fragments).

Bibliography — 141 references.

Received 13th December 2001