



УДК 577.113.(3+4):547.435.057

## СИНТЕЗ И СВОЙСТВА МЕТИЛЕНКАРБОКСАМИДНЫХ МИМЕТИКОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ОСНОВЕ МОРФОЛИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ

© 2012 г. Т. В. Абрамова<sup>#</sup>, М. Ф. Касакин, Ю. В. Тарасенко, А. А. Ломзов, В. В. Коваль,  
Д. В. Пышный, В. Н. Сильников

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8*

Поступила в редакцию 11.07.2011 г. Принята к печати 12.12.2011 г.

Синтезированы урацил- и аденинсодержащие олигомеры на основе карбоксиметильных производных морфолиновых аналогов нуклеозидов (MorGly) с использованием методов пептидного синтеза. Найдены условия анализа гомогенности протонируемых в физиологических условиях миметиков нуклеиновых кислот методом капиллярного электрофореза. Обнаружено, что термостабильность комплементарных комплексов MorGly-олигомеров существенно зависит от состава гетероциклических оснований модифицированной цепи (урацил или аденин). По результатам исследования тандемных комплексов сделан вывод о более существенном вкладе кооперативных взаимодействий на стыке модифицированных олигомеров в их термостабильность, чем в случае природных олигодезоксирибоаденилатов. Аденинсодержащие MorGly-олигомеры образуют более стабильные комплексы с poly(U), чем природный олигодезоксирибоаденилат такой же длины. Комплексы модифицированных олигомеров с полирибонуклеотидами обладают большей термостабильностью в сравнении с полидезоксирибонуклеотидами.

*Ключевые слова:* аналоги олигонуклеотидов, миметики НК, нуклеозиды, морфолиновые аналоги, капиллярный электрофорез.

### ВВЕДЕНИЕ

Практическим следствием огромных усилий молекулярных биологов конца двадцатого века, направленных на идентификацию и расшифровку человеческого генома, стало развитие нового направления в медицине. Проблемы здоровья и болезней человека стали рассматриваться на молекулярном уровне, прежде всего, на уровне функции нуклеиновых кислот. Основные разделы молекулярной медицины, уже получившие реальное развитие, это молекулярная диагностика, превентивная (профилактическая) медицина и генная терапия. Вместе с тем стремительный рост исследований в области генной терапии потребовал создания новых инструментов, способных направленно воздействовать на генетический аппарат клеток. Начиная с первых работ, нацеленных на сайт-специфичную модификацию нуклеиновых кислот, и по настоящее время, наиболее пер-

спективными кандидатами на роль таких инструментов являются природные или синтетические аналоги олигонуклеотидов (АО) [1]. К настоящему времени накоплен обширный экспериментальный материал по синтезу и свойствам АО десятков различных типов [2–4]. Одними из самых удачных примеров применения таких соединений в области регуляции экспрессии генов следует признать морфолиновые аналоги олигонуклеотидов [5].

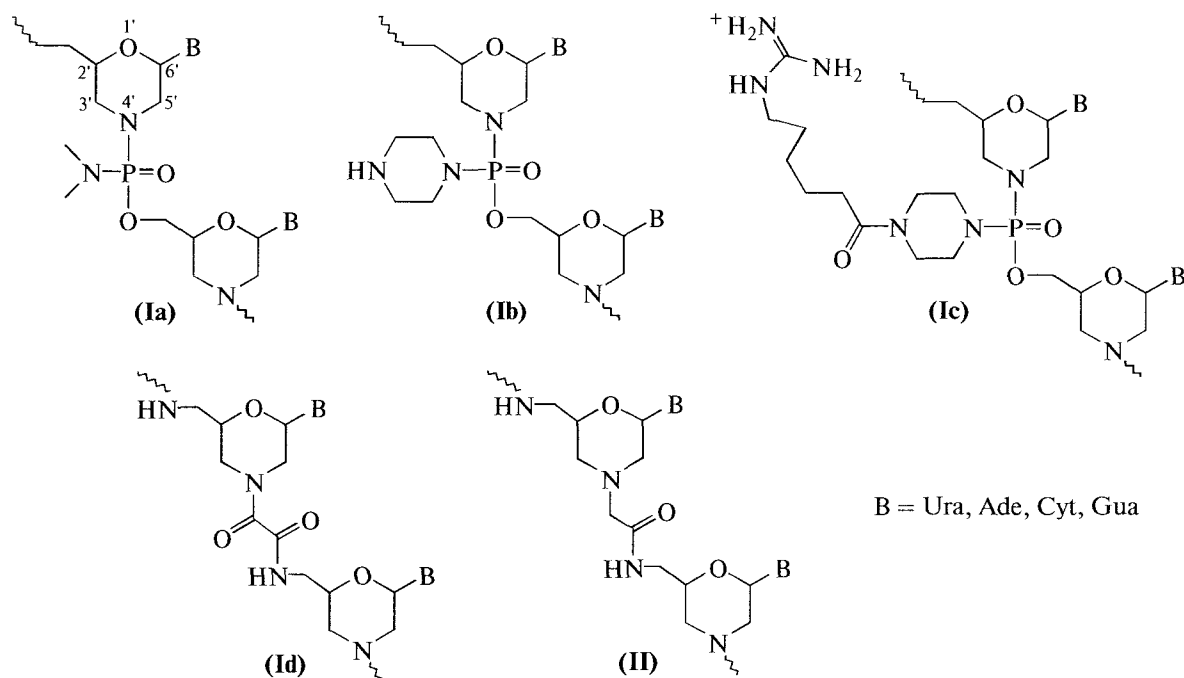
На основе коммерчески доступных диметил-амидоморфолидофосфатных миметиков (**Ia**) синтезируются различные конъюгаты с репортерными или реакционноспособными группами. Для решения задач по выяснению молекулярных механизмов функционирования генома в процессе эмбрионального развития получены фотоактивируемые производные морфолиновых олигонуклеотидов [6]. Предложены новые диамидофосфатные положительно заряженные и протонируемые при физиологических pH морфолиновые АО (**Ib**)–(**Ic**), направленные на подавление вирусных и бактериальных инфекций [7, 8]. Однако олигомеры (**Ia**)–(**Ic**) содержат дополнительный хиральный центр по атому фосфора. Обычно они используются в виде рацемической смеси олигомеров без разделения на индивидуальные соединения [8]. Свойства этих диастереомеров резко различаются [9], что

Сокращения: MorGly – 4'-карбоксиметильные производные морфолиновых аналогов нуклеозидов, НОВt – 1-гидроксibenзотриазол, НВТУ – гексафторфосфат *O*-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-*N,N,N,N*-тетраметилурия, DIPEA – диизопропилэтиламин, Nb – *n*-нитробензил, РАМ – фенил-ацетамидометил, РЕI – полиэтиленимин.

<sup>#</sup> Автор для связи: тел.: +7 (383) 363-51-83; факс: +7 (383) 363-51-82; эл. почта: abramova@niboch.nsc.ru.

может быть фактором, определяющим эффективность таких взаимодействий с НК, как образова-

ние комплементарных комплексов и других более сложных структур [10].



Ранее мы сообщали о морфолиновых аналогах олигонуклеотидов не содержащих хиральных центров в соединяющих мономеры группах [11]. Однако, олигоуридилатные аналоги, в которых мономерные звенья соединены жестким оксалатным линкером (**Id**), оказались не способны образовывать прочные комплементарные комплексы с нативными НК [12].

В работе [13] впервые была предложена структура морфолиновых аналогов олигоуридилатов и олигоаденилатов (**II**), в которых мономерные звенья соединены более гибким глициновым (карбоксамидометильным) линкером. Однако за последующее десятилетие синтез и свойства таких аналогов более подробно так и не были описаны.

В настоящей работе мы синтезировали урацил- и аденинсодержащие морфолиновые олигокарбоксамиды (**II**) в растворе и на полимере и провели сравнение термической стабильности их комплементарных комплексов с ДНК и РНК.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

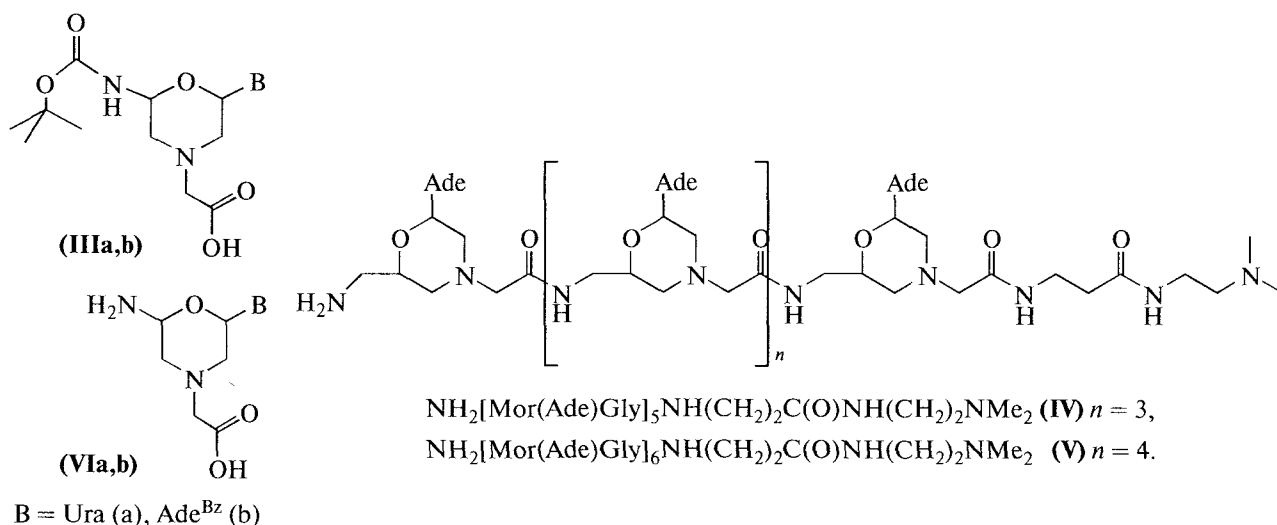
Синтез аналогов олигонуклеотидов типа (**II**) был осуществлен с использованием 2'-Вос-аминометил-4'-карбоксиметилморфолиновых мономеров (**IIIa,b**), получение которых описано ранее [14]. Поскольку они представляют собой аминокислоты, аминогруппа которых содержит кисло-

толабильную Вос-защиту, для синтеза олигомеров нами были предприняты попытки использовать Вос-стратегию твердофазного варианта синтеза в ручном режиме. Последовательность операций деблокирования аминогруппы и конденсации приведена в табл. 1. Предварительную активацию карбоксикомпонента проводили с помощью НВТУ по методикам, разработанным для Вос-стратегии синтеза ПНК [15].

После завершения всех стадий конденсации и удаления Вос-защитной группы отщепление олигомера от смолы проводили путем обработки *N,N*-диметиламиноэтилендиамином. Однако в случае протяженных аденинсодержащих олигокарбоксамидов (более 6 мономерных звеньев) после отщепления АО от смолы получались сложные смеси, выделить из которых целевые продукты не удалось. Проведенный постадийный контроль синтеза продемонстрировал, что выход при присоединении мономеров к растущей цепи уже на начальном этапе синтеза падал приблизительно в два раза на каждую последующую стадию конденсации. При этом присоединение первого и второго мономерного звена протекает с удовлетворительным выходом (95%). Таким образом, с использованием протокола синтеза, представленного в табл. 1, были получены аденинсодержащие пентамер  $\text{NH}_2[\text{Mor}(\text{Ade})\text{Gly}]_5\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2$  (**IV**) и гексамер  $\text{NH}_2[\text{Mor}(\text{Ade})\text{Gly}]_6\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$  (**V**).

**Таблица 1.** Протокол твердофазного синтеза олигомеров 4'-карбоксиметильных морфолиновых нуклеозидных аналогов (0.05 г носителя Вос-βAla-РАМ, емкость 0.2 ммоль/г)

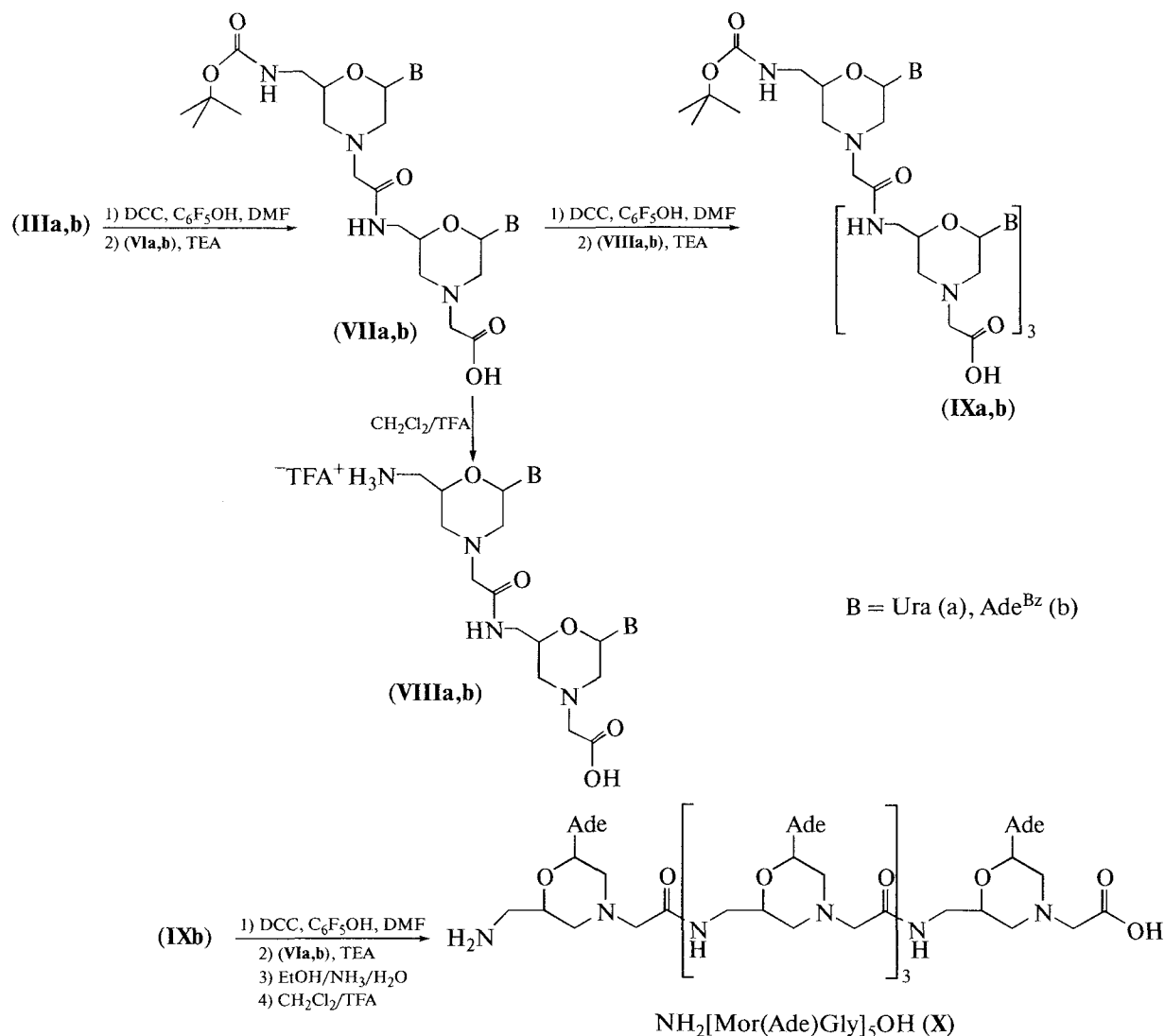
| Операция              | Реагенты  | Длительность  |
|-----------------------|---|---|
| Удаление Вос-защиты   | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> –TFA, 1 : 4, 2 × 1 мл   | 2 × 10 мин  |
| Промывка              | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 1 мл; DMSO, 0.5 мл;<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 1 мл; DMSO, 0.5 мл;<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 1 мл  | Последовательно по 3 мин  |
| Высушивание в вакууме |   | 5 мин   |
| Конденсация           | DMSO–DIPEA, 9 : 1, 2 × 0.5 мл<br>К раствору мономера ( <b>IIIb</b> ) (0.015 г, 0.039 ммоль) и НВТУ (0.01 г, 0.026 ммоль) в 0.2 мл DMSO добавляют TEA (0.02 мл, 0.14 ммоль) и смесь добавляют к носителю | 2 × 10 мин<br>Предварительная активация 10 мин<br>Конденсация 4 ч |
| Промывка              | Последовательно: DMSO, 0.5 мл;<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 1 мл; DMSO, 0.5 мл;<br>CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 1 мл   | По 3 мин  |
| Высушивание в вакууме |   | 5 мин   |



Альтернативой твердофазному синтезу таких олигомеров является стратегия блочного построения цепи (схемы 1 и 2). Для максимального упрощения синтеза на первом этапе было решено отказаться от защиты концевой карбоксильной группы (схема 1). Активацию осуществляли с помощью DCC в присутствии *N*-гидроксисукцинимиды, пентафторфенола или 1-гидроксисбензотриазола. Образовавшиеся активированные эфиры использовали на стадии конденсации без выделения и очистки.

Полученные димеры (**VII**) после удаления *N*-защитной группы с образованием соединений (**VIII**) были использованы в качестве аминок компонента для синтеза тетрамеров (схема 1). Выход тетраме-

ров (**IXa,b**) составлял около 25, 50 и 10% при использовании на стадии активации димеров (**VIIa,b**) *N*-гидроксисукцинимиды, пентафторфенола и НОВт, соответственно. Однако для получения более протяженных олигомеров с приемлемыми выходами необходимо использовать значительные избытки аминок компонента, что крайне затрудняет выделение целевых соединений из реакционной смеси и делает такой подход экономически более трудоемким. Тем не менее, с помощью этого подхода, используя в качестве карбоксикомпонента соединение (**IXb**), а в качестве аминок компонента мономер (**VIb**), удалось получить пентамер  $\text{NH}_2[\text{Mor}(\text{Ade})\text{Gly}]_5\text{OH}$  (**X**) (схема 1).



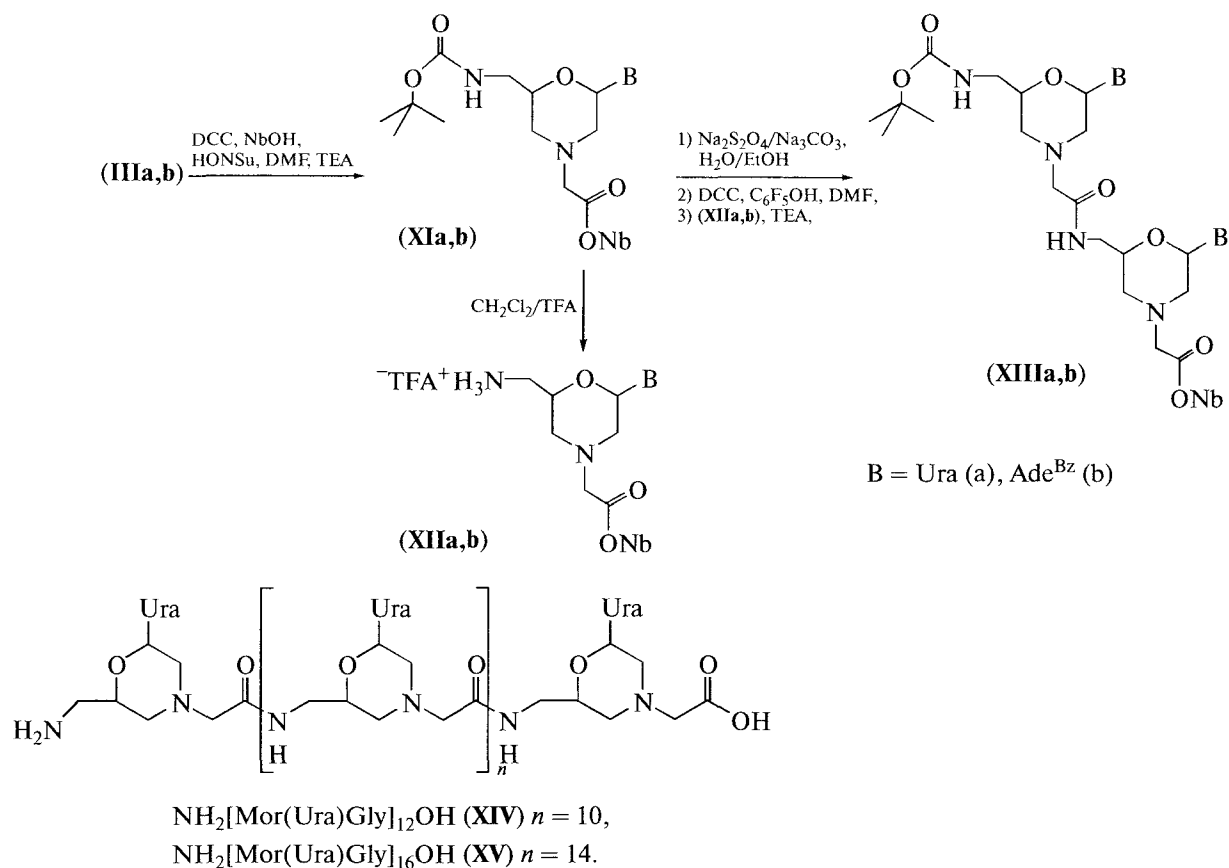
**Схема 1.** Синтез олигомеров 4'-карбоксиметильных морфолиновых нуклеозидных аналогов в растворе без защиты карбоксильной группы.

Резкое снижение выходов при увеличении длины синтезируемого АО обусловлено рядом причин. Наиболее значимыми являются значительное снижение растворимости незащищенных олигомеров в органических растворителях и накопление побочных продуктов реакции, связанных с участием свободной карбоксильной группы аминокомпоненты. Для решения этих проблем нами были использованы мономеры или олигомеры в виде *n*-нитробензиловых эфиров по карбоксильной группе (схема 2).

Использование *n*-нитробензинового эфира аминокомпонента (XIa,b), имеющего повышенную растворимость в органических растворителях, позволяет легко контролировать протекание реакций спектрофотометрически, и в тоже время

эта защитная группа может быть легко удалена при pH 8.0 дитионитом натрия [16].

Конденсация урацилсодержащих мономеров, димеров и тетрамеров протекала достаточно эффективно в присутствии DCC и *N*-гидроксисукцинимиды в DMF. С целью повышения эффективности конденсации без применения большого избытка аминокомпонента при реакции с участием октамеров BocNH[Mor(Ura)Gly]<sub>8</sub>OH и NH<sub>2</sub>[Mor(Ura)Gly]<sub>8</sub>ONb мы использовали пентафторфениловые активированные эфиры карбокси-компонентов. Таким образом, применяя блочный метод, после удаления всех защитных групп мы получили урацилсодержащие додекамер NH<sub>2</sub>[Mor(Ura)Gly]<sub>12</sub>OH (XIV) и гексадекамер NH<sub>2</sub>[Mor(Ura)Gly]<sub>16</sub>OH (XV).



**Схема 2.** Синтез олигомеров 4'-карбоксиметильных морфолиновых нуклеозидных аналогов в растворе с использованием *n*-нитробензильной защитной группы.

Структуру соответствующим образом защищенных олигомерных amino- и карбоксикомпонентов подтверждали по соотношению интегральных интенсивностей характерных сигналов протонов, относящихся к Вос-защитной группе, *n*-нитробензильной защитной группе, протонов в положении 6 и 2' в <sup>1</sup>H-ЯМР-спектре. Кроме того, использовали отношение величин  $A_{260}$  (характерно для остатка урацила) и  $A_{300}$  (характерно для *n*-нитробензильного остатка) в спектре УФ-поглощения (табл. 2).

К сожалению, получить согласно схеме 2 протяженные аденинсодержащие олигомеры не удалось. По-видимому, отмечаемые в литературе факты низкой эффективности конденсации пуринсодержащих мономеров в синтезе ПНК на полимере [17] имеют общий характер. Для повышения эффективности требуются дополнительные исследования, направленные на подбор конденсирующих реагентов, растворителей, защитных групп и условий реакции. В то же время, согласно литературным данным [18, 19], протонируемые или катионсодержащие АО длиной в 5 или 6 звеньев образуют комплементарные ком-

плексы с высокой термостабильностью, достаточной для сравнительного изучения сродства олигомеров к ДНК и РНК.

Таким образом, нами предложены схемы синтеза урацил- и аденинсодержащих олигомеров MorGly на основе морфолиновых нуклеозидов в растворе и на полимере с помощью методов пептидной химии. Олигомеры длиной до 5 звеньев удобно получать с помощью блочного метода в растворе, исходя из Вос-защищенных мономеров без дополнительной защиты карбоксильной группы. При использовании в качестве аминокон компонента мономеров, защищенных по карбоксигруппе *n*-нитробензильной защитной группой, возможен синтез урацилсодержащих олигомеров длиной до 16 звеньев, однако синтез аденинсодержащих олигомеров протекает неэффективно.

В настоящее время, по завершении синтеза олигомеров (например, аналогов пептидных нуклеиновых кислот или пептидов) на полимерном носителе после отщепления продукта от смолы очистку целевого продукта проводят, как правило, методом офВЭЖХ в присутствии 0.1% TFA, а затем подтверждают структуру целевого продукта

**Таблица 2.** Соотношение интегральных интенсивностей сигналов протонов<sup>a</sup>, характерных для карбокси- и аминоконпонентов реакции конденсации (схема 2)

| Олигомер  | H6(Ura)/Вос-протоны/-CH <sub>2</sub> -протоны Nb/ароматические протоны Nb/H2' NH <sub>2</sub> -конец олигомера/остальные H2'-протоны | A <sub>300</sub> /A <sub>260</sub> |
|---|--|------------------------------------|
| NH <sub>2</sub> [Mor(Ura)Gly]ONb (XIIa)         | Данные приведены в Эксп. части   | 0.22                               |
| ВосNH[Mor(Ura)Gly] <sub>2</sub> OH              | 1/4.6/--/--/0.53/0.55  | —                                  |
| NH <sub>2</sub> [Mor(Ura)Gly] <sub>2</sub> ONb  | 1/--/1.04/1.05 + 1.07/0.51/0.50  | 0.13                               |
| ВосNH[Mor(Ura)Gly] <sub>4</sub> OH              | 1/2.38/--/--/0.29/0.73   |                                    |
| NH <sub>2</sub> [Mor(Ura)Gly] <sub>4</sub> ONb  | 1/--/0.53/0.65 + 0.55/0.27/0.80  | 0.09                               |
| ВосNH[Mor(Ura)Gly] <sub>8</sub> OH              | 1/1.23/--/--/0.14/0.78   |                                    |
| NH <sub>2</sub> [Mor(Ura)Gly] <sub>8</sub> ONb  | 1/--/0.30/0.35 + 0.35/0.14/0.84  | 0.06                               |
| NH <sub>2</sub> [Mor(Ura)Gly] <sub>16</sub> ONb | —  | 0.03                               |

<sup>a</sup> <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры записаны в смеси D<sub>2</sub>O/DMSO-*d*<sub>6</sub>.

методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии [20]. Однако в случае заряженных гидрофобных молекул при длине олигомеров более 4 мономерных звеньев подобрать условия для разделения каждой реакционной смеси методом ВЭЖХ становится нетривиальной задачей. Учитывая повышенный интерес к синтезу положительно заряженных миметиков НК [8, 19], разработка универсального метода анализа состава реакционных смесей и гомогенности выделенных олигомеров является весьма актуальной задачей.

Катионные АО и в частности 4'-карбоксамидометильные морфолиновые аналоги (II), представляющие собой протонируемые при физиологических условиях pH олигомеры (рK<sub>вн+</sub> 7.38 для *N*-метилморфолина), можно анализировать в зависимости от числа зарядов и массы, аналогично анализу природных олигонуклеотидов с помощью капиллярного электрофореза. Преимуществами данного метода по сравнению с обычным гель-электрофорезом являются быстрота проведения анализа и малые количества образца. В то же время широко применяемая методика анализа смесей олигонуклеотидов с помощью капиллярного гель-электрофореза в ПААГ [21] не пригодна в случае положительно заряженных олигомеров. В основном сложность заключается в осуществлении ПААГ-электрофореза в кислых условиях и в сорбции аминокосоединений на поверхности кварцевых капилляров в случае проведения анализа в отсутствие стационарной фазы. Ранее было предложено с целью уменьшения сорбции при анализе белков обрабатывать кварцевые капилля-

ры положительно заряженными полимерами, например, полиэтиленимином [22]. При этом происходит обращение электроосмотического потока, что делает возможным анализ положительно заряженных соединений в зависимости от числа зарядов или от размера молекул [23]. Опираясь на эти данные, мы разработали методику анализа реакционных смесей синтеза олигокарбоксамидов и гомогенности полученных олигомеров (IV), (V), (X), (XIV), (XV) с помощью капиллярного электрофореза в условиях обращенного электроосмотического потока (рис. 1).

Очистку продуктов, синтезированных по схемам 1, 2 и на полимере, проводили с помощью катионообменной хроматографии на колонке с SP-сефарозой в градиенте концентрации NaCl в присутствии 0.1% TFA с последующим обессоливанием целевых фракций офВЭЖХ. Структуру полученных олигомеров подтверждали с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала в многоволновом режиме детекции проведено исследование комплексообразующих свойств модифицированных олигомеров в стандартных условиях (табл. 3). Исследование термостабильности комплементарных комплексов природных олиго- и полинуклеотидов и их синтетических аналогов в таких условиях (1 М NaCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.0) позволяет сравнить параметры перехода спираль-клубок и оценить эффекты

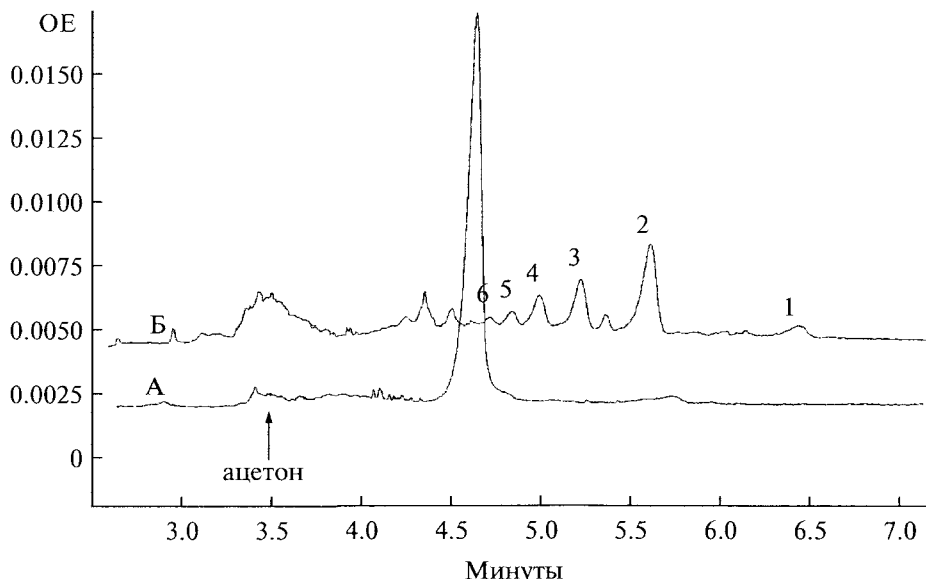


Рис. 1. Профили УФ-поглощения при анализе образцов с помощью капиллярного электрофореза (условия см. в Экспериментальной части). А: очищенный олигомер (X); Б: реакционная смесь твердофазного синтеза аденинсодержащих олигомеров после отщепления от носителя (7 стадий конденсации); цифрами обозначена длина олигомеров.

взаимодействия между ближайшими соседями в тандемных комплексах [24].

Согласно полученным данным, ни один из пента- и гексамеров не образует стабильного комплекса с комплементарными олигодезоксирибонуклеотидами (табл. 3, комплексы 1, 5, 10, 15, 17). При образовании тандемных структур в модельных системах с двумя последовательно расположенными гексамерами стабильность комплекса с природными олигомерами, выше, чем с нашими протонируемыми аналогами ( $T_{\max} = 38.0$  и  $\sim 18.0^\circ\text{C}$ , где  $T_{\max}$  — это температура плавления комплекса, соответствующая максимуму на дифференциальной кривой термической денатурации). Подобный эффект, хотя и менее выраженный, наблюдается при формировании тандемных структур в модельной системе, состоящей из трех последовательно расположенных пентамеров (температуры плавления тандемных комплексов олигомеров  $(dA)_5$ , (X) и (IV) с  $(dT)_{16}$  составили 37.5, 34.0 и  $31.5^\circ\text{C}$ ). Интересно, что в этом случае модифицированный олигомер, содержащий карбоксигруппу, образует комплементарный комплекс с температурой плавления на  $2.5^\circ\text{C}$  выше, чем олигомер (IV), содержащий дополнительный линкер. Вероятными причинами этого является стерические препятствия для эффективного формирования кооперативного контакта, создаваемые линкером.

Из сравнения температур плавления комплексов пяти- и шестизвенных модифицированных олигомеров с  $oligo(dT)$ -мишенями видно, что наличие двух кооперативных контактов в большей

степени стабилизирует комплекс ( $34$  и  $31.5^\circ\text{C}$ ), чем наличие только одного ( $18^\circ\text{C}$ ). Температуры плавления для природной  $oligo(dA)$ -мишени аналогичных комплексов —  $37.5$  и  $38^\circ\text{C}$ . Таким образом, кооперативные взаимодействия на стыке дуплексных структур вносят в термическую стабильность производных НК больший вклад, чем в случае олигонуклеотидов природного строения.

При изучении термостабильности комплементарных тандемных комплексов  $(dA)_5$  олигомеров (X) и (IV) с  $poly(dT)$  температуры плавления составили  $59.1$ ,  $51.4$ ,  $49.3^\circ\text{C}$ . Температуры плавления комплексов олигомеров, образованных с  $dT_{16}$  в тех же концентрационных условиях, оказываются значительно ниже ( $37.5$ ,  $31.5$  и  $28.5^\circ\text{C}$ ), что свидетельствует о формировании более протяженных тандемных комплексов, содержащих более чем три олигоаденилата подряд. На рис. 2 приведены дифференциальные кривые термической денатурации комплексов пентамеров.

Сравнительное исследование термостабильности комплексов природных пентамеров и их синтетических аналогов с  $poly(U)$  и  $poly(dT)$  показало, что природный ДНК-тандемный комплекс  $(dA)_5$  с  $poly(dT)$  стабильнее, чем гибридный комплекс  $(dA)_5$  с  $poly(U)$  ( $59.1$  и  $48.1^\circ\text{C}$ ). В противоположность этому морфолиновые производные в комплексе с РНК-полимерной матрицей образуют более стабильные дуплексные структуры. Интересно, что в случае комплементарного рибополимера  $poly(U)$  модифицированные олигомеры (X) и (IV) образуют более стабильный комплекс, чем  $dA_5$  ( $55.0$ ,  $52.8$  и  $48.1^\circ\text{C}$ ). При этом

Таблица 3. Температуры термической денатурации исследованных комплементарных комплексов

| Номер комплекса | Олигомер   | Комплементарная цепь                                | $T_{\max}$ , °C                        |
|-----------------|--|---|--|
| 1               | (dA) <sub>5</sub>  | d(CT <sub>5</sub> C)                                | <0 <sup>a</sup>                        |
| 2               | (dA) <sub>5</sub>  | (dT) <sub>16</sub>                                  | 37.5 <sup>b</sup> (37.5 <sup>b</sup> ) |
| 3               | (dA) <sub>5</sub>  | poly(dT)  | 59.1 <sup>b</sup>                      |
| 4               | (dA) <sub>5</sub>  | poly(U)   | 48.1 <sup>b</sup>                      |
| 5               | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>5</sub> OH (X)  | d(CT <sub>5</sub> C)                                | <5 <sup>a</sup>                        |
| 6               | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>5</sub> OH (X)  | (dT) <sub>16</sub>                                  | 34.0 <sup>b</sup> (31.5 <sup>b</sup> ) |
| 7               | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>5</sub> OH (X)  | poly(dT)  | 51.4 <sup>b</sup>                      |
| 8               | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>5</sub> OH (X)  | poly(U)   | 55.0 <sup>b</sup>                      |
| 9               | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>5</sub> OH (X)  | NH <sub>2</sub> [Mor(Ura)Gly] <sub>16</sub> OH (XV) | Отсутствует <sup>b</sup>               |
| 10              | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>5</sub> NMe <sub>2</sub> (IV)   | d(CT <sub>5</sub> C)                                | <0 <sup>a</sup>                        |
| 11              | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>5</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(O)NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub> (IV) | (dT) <sub>16</sub>                                  | 31.5 <sup>b</sup> (28.5 <sup>b</sup> ) |
| 12              | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>5</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(O)NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub> (IV) | poly(T)   | 49.3 <sup>b</sup>                      |
| 13              | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>5</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(O)NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub> (IV) | poly(U)   | 52.8 <sup>b</sup>                      |
| 14              | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>5</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(O)NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub> (IV) | NH <sub>2</sub> [Mor(Ura)Gly] <sub>16</sub> OH (XV) | Отсутствует <sup>b</sup>               |
| 15              | (dA) <sub>6</sub>  | d(CT <sub>6</sub> C)                                | <5 <sup>a</sup>                        |
| 16              | (dA) <sub>6</sub>  | d(T) <sub>12</sub>                                  | 38.0 <sup>b</sup>                      |
| 17              | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>6</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(O)NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub> (V)  | d(CT <sub>6</sub> C)                                | <10 <sup>a</sup>                       |
| 18              | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>6</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(O)NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub> (V)  | d(T) <sub>12</sub>                                  | ~18.0 <sup>b</sup>                     |
| 19              | NH <sub>2</sub> [Mor(Ade)Gly] <sub>6</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(O)NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub> (V)  | NH <sub>2</sub> [Mor(Ura)Gly] <sub>16</sub> OH (XV) | Отсутствует <sup>b</sup>               |
| 20              | NH <sub>2</sub> [Mor(Ura)Gly] <sub>12</sub> OH (XIV)   | d(CA <sub>12</sub> C)                               | Отсутствует <sup>a</sup>               |
| 21              | NH <sub>2</sub> [Mor(Ura)Gly] <sub>12</sub> OH (XIV)   | poly(A)   | Отсутствует <sup>b</sup>               |
| 22              | NH <sub>2</sub> [Mor(Ura)Gly] <sub>16</sub> OH (XV)  | d(CA <sub>16</sub> C)                               | Отсутствует <sup>a</sup>               |
| 23              | NH <sub>2</sub> [Mor(Ura)Gly] <sub>16</sub> OH (XV)  | poly(A)   | Отсутствует <sup>b</sup>               |

<sup>a</sup> Концентрация каждого из компонентов в смеси олигонуклеотидов:  $5 \times 10^{-5}$  М.

<sup>b</sup> Концентрация олигомера большей длины  $5 \times 10^{-5}$  М. Более короткого компонента взято в эквимольном количестве в расчете на мономерное звено.

<sup>В</sup> Суммарная концентрация в расчете на мономерное звено олигомеров и полимера, взятых в эквимольном соотношении,  $2.5 \times 10^{-4}$  М.

как с poly(U), так и с poly(dT) дуплексные структуры олигомера (X), содержащего карбоксигруппу, имеют температуру плавления выше, чем олигомера (IV), содержащего дополнительный диметиламиноэтильный остаток.

Необходимо отметить, что в экспериментах с участием полимерных матриц при скорости нагрева/охлаждения 0.5°C/мин и выше мы наблюдали гистерезис кривых денатурации/ренатурации, хотя и менее выраженный, чем в работах по изучению пирролидинамидных миметиков НК [18]. При скорости нагрева/охлаждения 0.3°C/мин, гистерезис практически отсутствовал ( $\leq 0.2^\circ\text{C}$ , что соответствовало величине экспериментальной ошибки определения  $T_{\max}$ ). Наличие

гистерезиса связано с неравновесностью термической денатурации при высокой скорости изменения температуры. При эквимольном соотношении нуклеотидов полимерной матрицы и коротких олигонуклеотидов энергетически выгодно образование тандемных комплексов олигонуклеотидов, в которых оба конца олигомеров находятся в контакте с соседними структурами (образуется два кооперативных контакта).

В отличие от модифицированных аденинсодержащих олигомеров, при изучении модифицированных урацилсодержащих олигомеров (XIV) и (XV) мы не зафиксировали образования комплементарных комплексов ни с олигомерными, ни с полимерными мишенями (X), (IV), (V), (XIV) и



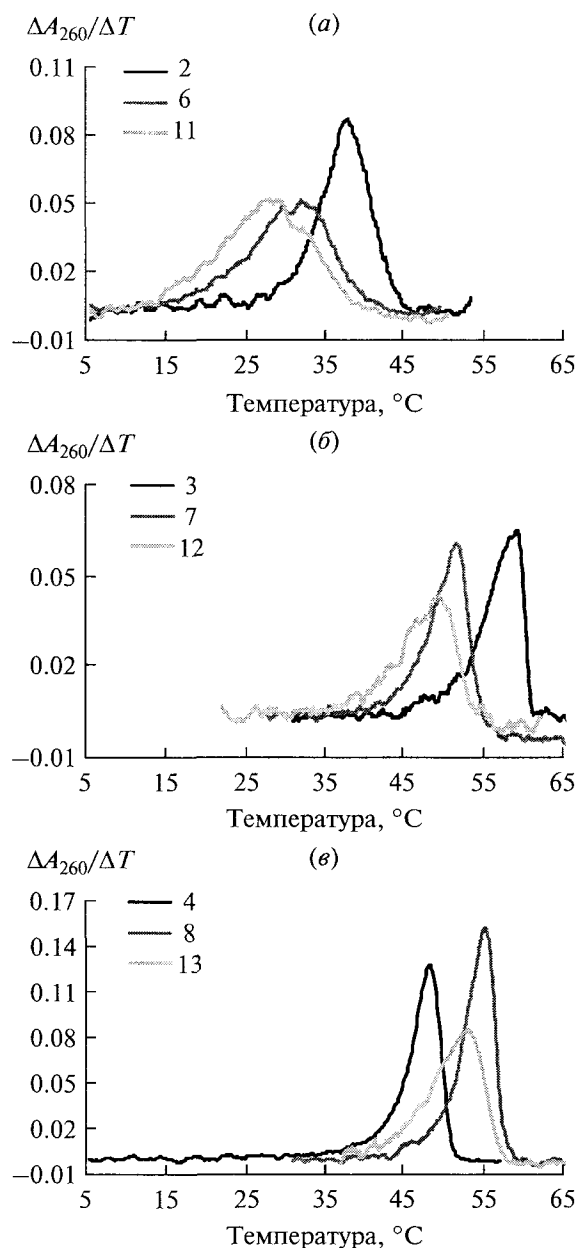


Рис. 2. Дифференциальные кривые термической денатурации комплексов нативных и модифицированных олигомеров с  $T_{16}$  (а), poly(dT) (б) и poly(U) (в) при концентрациях  $5 \times 10^{-5}$  М в расчете на мономерное звено, зарегистрированные на  $\lambda = 260$  нм. Номера кривых соответствуют номерам образцов в табл. 3.

(dA)<sub>6</sub>). Это может быть объяснено пониженной способностью урацильных остатков по сравнению с адениновыми к участию в стэкинг-взаимодействиях.

Проведенные исследования термической стабильности комплементарных комплексов природных олигонуклеотидов и модифицированных MorGly-олигомеров в растворах с высокой ионной силой позволяют сделать вывод о решающей роли

стэкинг-взаимодействий при образовании tandemных комплементарных комплексов MorGly-олигомеров в таких условиях. Показано, что термостабильность комплементарных комплексов модифицированных олигомеров зависит от состава гетероциклических оснований. Для подробного изучения структуры комплексов модифицированных олигомеров и вклада в их стабильность ионных взаимодействий между комплементарными цепями необходимы дальнейшие исследования.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие реактивы: DCC, *N,N*-диметилендиамин, *N*-гидроксисукцинимид, 1-гидроксibenзотриазол, полиэтиленимин 25000D, трис(гидроксиметил)аминометан (Aldrich, США), диизопропилэтиламин (Fluka Chemie, Швейцария), олигодезоксирибонуклеотиды (Биоссет, Россия), poly(U), poly(A), poly(dT) (Sigma, США). Морфолиновые нуклеозиды (IIIa,b) и (VIa,b) синтезировали, как описано в работе [14]. В твердофазном синтезе в качестве носителя использовали Вос-βAla-РАМ-Resin (200–400 mesh, 0.26 ммоль/г) 1% дивинилбензола (Peptides International, США). Остальные реактивы и растворители отечественного производства. Перед использованием растворители очищали стандартными методами в случае необходимости. Анализы реакционных смесей методом офВЭЖХ проводили на приборе Милихром А-02 (Эконова, Россия), колонка  $2 \times 75$  мм, сорбент ProntoSIL 120-5-C18, в градиенте концентрации буфера Б (0.1 М ТЕА–АсОН, рН 7.0, 80% водный ацетонитрил) в буфере А (0.1 М ТЕА–АсОН, рН 7.0, вода), с регистрацией УФ-поглощения в процессе хроматографии при 250, 260, 280 и 300 нм. ТСХ проводили на пластинках с силикагелем Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ) в подходящих системах растворителей (см. ниже). Обратенно-фазовую колоночную хроматографию проводили с использованием Preparative Porasil C-18 (55–105 мкм, 125А) (Waters, США), катионообменную – на колонке SP-сефарозой HiTrap SP HP, 1 мл, (GE Healthcare, США), гель-фильтрацию – на колонке с Sephadex G-25 s/f (Pharmacia, Швеция). Состав элюентов указан в объемных процентах. Спектры ЯМР ( $\delta$ , м.д.; J, Гц) записывали на спектрометре AV-300 (Bruker, ФРГ). В качестве внутреннего стандарта для <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров использовали тетраметилсилан. Масс-спектры регистрировали с помощью масс-спектрометров Autoflex III (Bruker Daltonics, Inc) с использованием 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в качестве матрицы (MALDI-TOF) и Agilent Technologies ESI MSD XCT Ion Trap (США) (ESI) в ЦКП СО РАН “Протеомика”.

**Олигомеры (IV) и (V).** Синтез аденинсодержащих олигомеров (IV) и (V) проводили в ручном

режиме на 0.05 г смолы Вос-βAla-PAM по протоколу, приведенному в табл. 1. После завершения 6 стадий конденсации удаляли Вос-защитную группу, прибавляли к высушенному носителю *N,N*-диметилэтилендиамин (0.2 мл), выдерживали суспензию при 55°C 16 ч, промывали носитель этанолом (3 × 1 мл), 50% водным этанолом (3 × 1 мл), водой (3 × 1 мл). Фильтрат упаривали несколько раз с водой для удаления основного количества *N,N*-диметилэтилендиамина. Остаток после упаривания растворяли в 20% водном этаноле, содержащем 0.1% водную TFA (5 мл), и наносили на колонку с SP-сефарозой. Продукты реакции разделяли в линейном градиенте концентрации NaCl (0 → 4 М) в 20% водном этаноле, содержащем 0.1% TFA. Общий объем элюента 40 мл. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали, остатки растворяли в 0.1% водной TFA (1 мл) и дополнительно очищали с помощью офВЭЖХ (колонка 0.7 × 7.5 см) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0 → 40%) в 0.1% водной TFA. Общий объем элюента 50 мл. Получили пентамер (IV) (0.1 мкмоль), гексамер (V) (0.02 мкмоль). Масс-спектр (MALDI): пентамер (IV), C<sub>67</sub>H<sub>92</sub>N<sub>38</sub>O<sub>11</sub>:  $m/z$  1605.6 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>, вычислено 1604.78; гексамер (V), C<sub>79</sub>H<sub>107</sub>N<sub>45</sub>O<sub>13</sub>: вычислено 1893.91, найдено  $m/z$  1894.7 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>.

**Общая методика синтеза димеров (VIIa,b) (схема 1).** К раствору Вос-защищенного мономера (IIIa) или (IIIб) (0.4 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли пентафторфенол (0.6 ммоль, 0.11 г) и DCC (0.6 ммоль, 0.13 г). Раствор перемешивали в течение 4 ч, затем в реакционную смесь вносили раствор 0.7 ммоль аминомономера (VIa) или (VIb), соответственно, в смеси DMF (2 мл) и TEA (0.29 мл, 2.1 ммоль). Через 2 ч к реакционной смеси добавляли 1 М TEAB, pH 7.0 (4 мл), перемешивали 1 ч, отделяли осадок центрифугированием, надосадочную жидкость упаривали. Остаток растворяли в воде с добавлением нескольких капель этанола, продукт очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонка 2 × 30 см) в линейном градиенте концентрации этанола в воде (0 → 50%). Общий объем элюента 600 мл. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали. Остаток сушили в вакууме масляного насоса.

**[2'-(Вос-аминометил)-6'-(урацил-1-ил)морфолин-4'-метилкарбонил]-2'-аминометил-6'-(урацил-1-ил)-4'-(карбоксиметил)морфолин (VIIa)** синтезировали по приведенной выше методике, исходя из мономеров (IIIa) и (VIa) с выходом 68% (0.18 г, 0.27 ммоль).  $R_f$  0.37 (Pr<sup>t</sup>OH–H<sub>2</sub>O, 4 : 1). <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 7.75–7.55 (2 H, м, H6 (Ura)), 6.00–5.60 (4 H, м, H5(Ura), H6'), 4.24–4.11 (1 H, м, H2' (C-конец)), 3.91–3.75 (1 H, м, H2' (Вос-NH-конец)), 3.72–2.62 (14 H, м, H5', H3', NHCH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>CONH, NCH<sub>2</sub>COOH), 2.41–2.03 (2 H, м, H5',

H3'), 1.27 (9 H, с, CH<sub>3</sub>); масс-спектр (ESI), C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>: вычислено 650.27, найдено  $m/z$  649.5 [ $M - H$ ]<sup>-</sup>.

**[2'-(Вос-аминометил)-6'-(N<sup>6</sup>-бензоиладенин-9-ил)морфолин-4'-метилкарбонил]-2'-аминометил-6'-(N<sup>6</sup>-бензоиладенин-9-ил)-4'-карбоксиметилморфолин (VIIb)** синтезировали по приведенной выше методике, исходя из мономеров (IIIб) и (VIb) с выходом 70% (0.25 г, 0.28 ммоль).  $R_f$  0.47 (Pr<sup>t</sup>OH–H<sub>2</sub>O, 4 : 1). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 11.26 (1 H, уш.с, COOH), 8.83–8.61 (4 H, м, H8, H2), 8.30 (1 H, уш.с, NHCO), 8.14 (1 H, уш.с, NHCO), 8.05 (4 H, д,  $J$  8.3, *o*-H Bz), 7.64 (2 H, т,  $J$  7.3, *n*-H Bz), 7.54 (4 H, уш.т,  $J$  7.3, *m*-H Bz), 7.21 (0.5 H, уш.т,  $J$  6.2, CONHCH<sub>2</sub>), 6.97 (0.5 H, уш.т,  $J$  5.9, CONHCH<sub>2</sub>), 6.01 (1 H, д,  $J$  9.6, H6'), 5.95 (1 H, д,  $J$  9.6, H6'), 4.03–3.82 (2 H, м, H2'), 3.20–2.71 (14 H, м, H5', H3', NHCH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>CONH, NCH<sub>2</sub>COOH), 2.21–2.02 (2 H, м, H5', H3'), 1.35 (9 H, с, CH<sub>3</sub>); масс-спектр (ESI) C<sub>43</sub>H<sub>48</sub>N<sub>14</sub>O<sub>9</sub>: вычислено 904.37, найдено  $m/z$  903.7 [ $M - H$ ]<sup>-</sup>.

**Общая методика удаления Вос-защитной группы.** Защищенное производное (0.05 г) растворяли в смеси хлористого метилена и TFA 1 : 1 (2 мл). Раствор перемешивали 15 мин, затем упаривали, остаток сушили в вакууме масляного насоса.

**[2'-Аминометил-6'-(урацил-1-ил)морфолин-4'-метилкарбонил]-2'-аминометил-6'-(урацил-1-ил)-4'-карбоксиметилморфолин (VIIa).** Деблокированием соединения (VIIa) (0.1 г, 0.15 ммоль) получали 0.1 г (0.15 ммоль, выход 100%) трифторацетата соединения (VIIa).  $R_f$  0.23 (Pr<sup>t</sup>OH–H<sub>2</sub>O-конц. водн. аммиак, 7:2:1). <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 7.75–7.63 (2 H, м, H6 (Ura)), 6.10–5.95 (2 H, м, H6'), 5.85 (2 H, уш.д,  $J$  8.0, H5 (Ura)), 4.50–4.24 (2 H, м, H2'), 4.00–2.34 (16 H, м, H5', H3', NCH<sub>2</sub>COOH, NCH<sub>2</sub>CONH, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>); масс-спектр (ESI) C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>: вычислено 550.21, найдено  $m/z$  551.2 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>.

**[2'-Аминометил-6'-(N<sup>6</sup>-бензоиладенин-9-ил)морфолин-4'-метилкарбонил]-2'-аминометил-6'-(N<sup>6</sup>-бензоиладенин-9-ил)-4'-(карбоксиметил)морфолин (VIIb).** Деблокированием соединения (VIIb) (0.15 г, 0.17 ммоль) получали 0.15 г (0.15 ммоль, выход 100%) трифторацетата соединения (VIIb).  $R_f$  0.10 (Pr<sup>t</sup>OH–H<sub>2</sub>O, 4 : 1). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 8.85–8.51 (4 H, м, H8, H2), 8.10 (4 H, д,  $J$  8.3, *o*-H, Bz), 7.70 (2 H, т,  $J$  7.3, *n*-H, Bz), 7.63 (4 H, т,  $J$  7.3, *m*-H Bz), 6.11 (1 H, д,  $J$  9.6, H6'), 6.03 (H, д,  $J$  9.6, H6'), 4.12–3.78 (2 H, м, H2'), 3.20–2.55 (16 H, м, H5', H3', NCH<sub>2</sub>COOH, NCH<sub>2</sub>CONH, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>); масс-спектр (ESI), C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>N<sub>14</sub>O<sub>7</sub>: вычислено 804.32, найдено  $m/z$  805.2 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>.

**Общая методика синтеза тетрамеров (IXa,b) (схема 1).** Раствор Вос-защищенного димера

(VIIa) или (VIIb) (0.12 ммоль) в DMF (1 мл) добавляли к смеси пентафторфенола (0.035 г, 0.18 ммоль) и DCC (0.04 г, 0.18 ммоль). Раствор перемешивали 4 ч, к реакционной смеси добавляли раствор соединения (VIIIa) или (VIIIb) (0.15 ммоль) в смеси DMF (0.7 мл) и TEA (0.063 мл, 0.45 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 16 ч, к смеси добавляли 1 М TEAB, pH 7.0 (1 мл), выдерживали 1 ч и обрабатывали, как описано выше для синтеза димеров. Продукт выделяли с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонка  $2 \times 30$  см) в линейном градиенте концентрации этанола (0  $\rightarrow$  80%) в воде. Общий объем элюента 600 мл. Фракции, содержавшие целевой продукт, упаривали. Остаток сушили в вакууме масляного насоса.

**Тетрамер (IXa)** получили по приведенной выше методике исходя из димеров (VIIa) и (VIIIa). Выход 0.075 г (0.063 ммоль, 53%).  $R_f$  0.18 (Pr'OH–H<sub>2</sub>O, 4 : 1). <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 7.74–7.59 (4 H, м, H<sub>6</sub> (Ura)), 5.92–5.72 (4 H, м, H<sub>5</sub> (Ura)), 5.70–5.54 (4 H, м, H<sub>6'</sub>), 4.25–4.10 (1 H, м, H<sub>2'</sub> (Вос-NH-конец)), 4.01–3.80 (3 H, м, H<sub>2'</sub>), 3.62–2.70 (28 H, м, H<sub>5'</sub>, H<sub>3'</sub>, NHCH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>CONH), 2.36–2.07 (4 H, м, H<sub>5'</sub>, H<sub>3'</sub>), 1.39 (9 H, м, CH<sub>3</sub>); масс-спектр (ESI) C<sub>49</sub>H<sub>66</sub>N<sub>16</sub>O<sub>10</sub>: вычислено 1182.47, найдено  $m/z$  1182 [M – H]<sup>–</sup>.

**Тетрамер (IXb)** синтезировали по приведенной выше методике, исходя из димеров (VIIb) и (VIIIb). Получили 0.09 г тетрамера (IXb) (0.054 ммоль, выход 45%).  $R_f$  0.14 (Pr'OH–H<sub>2</sub>O 4 : 1). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 11.21 (1 H, с, –COOH), 8.85–8.56 (8 H, м, H<sub>2'</sub>, H<sub>8'</sub>), 8.32 (1 H, уш.с, –NHCO–), 8.17–8.08 (3 H, м, NHCO), 8.05 (8 H, уш.д, *J* 7.9, *o*-H, Vz), 7.64 (4 H, уш.т, *J* 7.3, *n*-H Vz), 7.54 (8 H, уш.т, *J* 7.3, *m*-H, Vz), 7.3 (0.5 H, уш.т, *J* 6.9, CONHCH<sub>2</sub>), 6.96 (0.5 H, уш.т, *J* 5.8, CONHCH<sub>2</sub>), 6.07–5.80 (4 H, м, H<sub>6'</sub>), 4.04–3.83 (4 H, м, H<sub>2'</sub>), 3.20–2.69 (28 H, м, H<sub>5'</sub>, H<sub>3'</sub>, NHCH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>CONH), 2.24–2.07 (4 H, м, H<sub>5'</sub>, H<sub>3'</sub>), 1.33 (9 H, м, CH<sub>3</sub>); масс-спектр (ESI) C<sub>49</sub>H<sub>66</sub>N<sub>16</sub>O<sub>10</sub>: вычислено 1690.68, найдено  $m/z$  1689.8 [M – H]<sup>–</sup>.

**Пентамер (X)**. Раствор тетрамера (IXb) (0.02 г, 0.012 ммоль) в DMF (0.5 мл) добавляли к смеси пентафторфенола (0.01 г, 0.05 ммоль) и DCC (0.01 г, 0.05 ммоль). Раствор перемешивали 4 ч, к реакционной смеси добавляли раствор соединения (VIb) (0.04 г, 0.1 ммоль) в DMF (0.5 мл) и TEA (0.1 мл, 0.7 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 16 ч, добавляли 1 М TEAB (1 мл), перемешивали 1 ч, затем упаривали досуха. Остаток растворяли в этаноле (2 мл), добавляли концентрированный водный аммиак (5 мл). Раствор перемешивали 2 сут при комнатной температуре, затем упаривали. Остаток растворяли в воде (3 мл), раствор промывали эфиром (2  $\times$  3 мл), водный слой упаривали. Вос-защитную группу уда-

ляли, как описано выше. Остаток после упаривания растворяли в 20% водном этаноле, содержащем 0.1% водную TFA (5 мл), и наносили на колонку с SP-сефарозой. Продукты реакции разделяли в линейном градиенте концентрации NaCl (0  $\rightarrow$  2 М) в 20% водном этаноле, содержащем 0.1% TFA. Общий объем элюента 40 мл. Фракции, содержавшие целевой продукт, упаривали, остаток растворяли в 0.1% водной TFA (1 мл). Продукт дополнительно очищали с помощью офВЭЖХ (колонка  $0.7 \times 7.5$  см) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0  $\rightarrow$  40%) в 0.1% водной TFA по 25 мл. Получили 1 мкмоль пентамера (X) (выход 8%). Гомогенность соединения подтверждали с помощью капиллярного электрофореза. Масс-спектр (MALDI) C<sub>60</sub>H<sub>77</sub>N<sub>35</sub>O<sub>11</sub>: вычислено 1463.65, найдено  $m/z$  1463.4 [M + H]<sup>+</sup>.

**Общая методика получения защищенных по карбоксильной группе мономеров (XIIa,b) (схема 2)**. Раствор Вос-защищенного мономера (IIIa) или (IIIb) (0.6 ммоль) в DMF (3 мл) добавляли к смеси *N*-гидроксисукцинимид (0.09 г, 0.8 ммоль), DCC (0.206 г, 1 ммоль), *n*-нитробензилового спирта (0.14 г, 0.9 ммоль) и TEA (0.17 мл, 1.2 ммоль). Раствор перемешивали 16 ч, осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в хлористом метиле (3 мл), и наносили на колонку с силикагелем (2  $\times$  20 см). Продукт элюировали в градиенте этанола в хлористом метиле (0  $\rightarrow$  5%). Целевые фракции упаривали. Полученные полностью защищенные мономеры (XIIa,b) растворяли в хлористом метиле, Вос-защитную группу удаляли, как описано выше. После упаривания остаток растворяли в 0.1% водной TFA (3 мл), защищенный по карбоксигруппе мономер очищали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонка  $2 \times 30$  см) в линейном градиенте концентрации этанола (0  $\rightarrow$  40%) в 0.1% водной TFA. Общий объем элюента 600 мл. Целевые фракции упаривали, остаток сушили в вакууме масляного насоса.

**2'-Аминометил-6'-(урацил-1-ил)-4'-(*n*-нитробензилоксикарбонилметил)морфолин (XIIa)** синтезировали по приведенной выше методике, исходя из мономера (IIIa), с выходом 83% (0.21 г защищенного производного (XIIa), 0.49 ммоль).  $R_f$  0.10 (Pr'OH–H<sub>2</sub>O 4 : 1). <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O/DMSO-*d*<sub>6</sub>): 8.16 (2 H, уш.д, *J* 8.6, *m*-H Ar), 7.66 (1 H, д, *J* 8.4, H<sub>6</sub>, Ura), 7.52 (2 H, уш.д, *J* 8.6, *o*-H, Ar), 5.77 (1 H, дд, *J* 9.0, 2.6, H<sub>6'</sub>), 5.76 (1 H, д, *J* 8.4, H<sub>5</sub>, Ura), 5.26 (1 H, д, *J* 13.8, OCH<sub>2</sub>Ar), 5.24 (1 H, д, *J* 13.8, OCH<sub>2</sub>Ar), 4.20–4.12 (1 H, м, H<sub>2'</sub>), 3.66 (1 H, д, *J* 17.1, NCH<sub>2</sub>CO), 3.64 (1 H, д, *J* 17.1, NCH<sub>2</sub>CO), 3.20–3.00 (4 H, м, H<sub>3'</sub>, H<sub>5'</sub>, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.60 (1 H, каж.т, *J* 11.0, H<sub>3'</sub>), 2.44 (1 H, каж.т, *J* 11.2, H<sub>5'</sub>); масс-спектр (ESI) C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>: вычислено 419.14, найдено  $m/z$  420.3 [M + H]<sup>+</sup>.

2'-Аминометил-6'-(*N*<sup>6</sup>-бензоиладенин-9-ил)-4'-(*n*-нитробензилоксикарбонилметил)морфолин (XIIb) синтезировали по приведенной выше методике, исходя из мономера (IIIb), с выходом 88% (0.27 г защищенного производного (XIIb), 0.51 ммоль).  $R_f$  0.20 (Pr<sup>1</sup>OH–H<sub>2</sub>O, 4 : 1). <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O/DMSO-*d*<sub>6</sub>): 8.79 (1 H, с, H2), 8.69 (1 H, с, H8), 8.21 (2 H, уш.д, *J* 8.8, *m*-H, Ar), 8.05 (2 H, уш.д, *J* 7.6, *o*-H, Bz), 7.76 (1 H, уш.т, *J* 7.3, *n*-H, Bz), 7.68 (4 H, м, *m*-H, Bz, *o*-H, Ar), 6.17 (1 H, дл, *J* 10.0, 2.4), 5.38 (1 H, д, *J* 13.3, OCH<sub>2</sub>Ar), 5.35 (1 H, д, *J* 13.3, OCH<sub>2</sub>Ar), 4.44–4.32 (1 H, м, H2'), 3.78 (1 H, д, *J* 17.4, NCH<sub>2</sub>CO), ), 3.72 (1 H, д, *J* 17.4, NCH<sub>2</sub>CO), 3.44–3.12 (5 H, м, H3', H5', NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.63 (1 H, каж.т, H5'); масс-спектр (ESI) C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>: вычислено 546.2, найдено *m/z* 546.9 [*M* + H]<sup>+</sup>.

**Общая методика синтеза димеров (XIIa,b) (схема 2).** К раствору Вос-защищенного мономера (IIIa) или (IIIб) (0.45 ммоль) в 3 мл DMF добавляли *N*-гидроксисукцинимид (0.075 г, 0.68 ммоль) или пентафторфенол (0.14 г, 0.75 ммоль), аминокомпонент (XIIa) или (XIIb), соответственно (0.49 ммоль), DCC (0.16 г, 0.75 ммоль) и TEA (0.11 мл, 0.75 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 16 ч, осадок отделяли фильтрованием, к фильтрату добавляли 15 мл хлористого метилена, раствор промывали 1 М калий-фосфатным буфером pH 7.0 (10 мл), органический слой упаривали. Остаток использовали для получения аминок- и карбоксикомпонентов последующих реакций конденсации. Выход определяли после очистки защищенных соответствующим образом блоков.

**Общая методика получения защищенных по карбоксильной группе олигомеров.** Остаток после упаривания реакции конденсации суспендировали в хлористом метилена и подвергали обработке TFA для удаления Вос-защитной группы и очистке с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии как описано выше для получения мономеров (XIIa,b). Выход аминокомпонента для следующей стадии конденсации в случае урацилсодержащих соединений 65–55%. Строение промежуточных олигомеров с защищенной карбоксильной группой подтверждали с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР и УФ-спектроскопии (табл. 2). В случае аденинсодержащих димеров выход не превышал 20%.

**Общая методика удаления *n*-нитробензильной защитной группы.** Раствор Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (0.29 г, 1.67 ммоль) и Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.19 г, 1.8 ммоль) в 1.5 мл воды при температуре 40°C, добавляли к раствору остатка после упаривания реакции конденсации в смеси этанол-хлористый метилен, 1 : 1 (3–5 мл) (см. выше). Суспензию перемешивали 1 ч, поддерживая pH около 8.0 добавлением водного 1 М раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, затем упаривали, а остаток суспендировали в воде (5 мл). Целевой продукт очи-

щали с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии (колонок 2 × 30 см) в линейном градиенте концентрации этанола (0 → 80%) в воде. Общий объем элюента 600 мл. Фракции, содержавшие целевой продукт, упаривали. Остаток сушили в вакууме масляного насоса. Выход карбоксикомпонента для следующей стадии конденсации в случае урацилсодержащих олигомеров 45–55%. Строение промежуточных олигомеров с защищенной аминокгруппой подтверждали с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР (табл. 2). В случае аденинсодержащих димеров выход не превышал 15%.

**Олигомеры (XIV) и (XV).** Для синтеза олигомера (XIV) проводили конденсацию урацилсодержащих Вос-защищенного октамера и тетрамера с защищенной карбоксигруппой, полученных по приведенным выше методикам. После завершения реакции реакционную смесь упаривали. Остаток подвергали обработке TFA для удаления Вос-защитной группы и очистке с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии, как описано выше, для получения мономеров (XIIa,b). Целевые фракции упаривали, остаток растворяли в 50% водном этаноле (2 мл). К раствору добавляли раствор Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (0.06 г, 0.34 ммоль) и Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.04 г, 0.38 ммоль) в воде (0.3 мл). Суспензию перемешивали 1 ч, затем упаривали. Остаток растворяли в 20% водном этаноле, продукт обессоливали с помощью гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-25 s/f в 20% водном этаноле. Фракции с высокомолекулярными продуктами упаривали. Остатки после упаривания растворяли в 20% водном этаноле, содержащем 0.1% TFA (5 мл), и наносили на колонку с SP-сефарозой. Продукты реакции разделяли в линейном градиенте концентрации NaCl (0 → 4 М) в 20% водном этаноле, содержащем 0.1% TFA. Общий объем элюента 40 мл. Фракции, содержавшие целевой продукт, упаривали, остаток растворяли в 0.1% водной TFA (3 мл). Продукт дополнительно очищали с помощью офВЭЖХ (колонок 0.7 × 7.5 см) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0 → 40%) в 0.1% водной TFA. Общий объем элюента 50 мл. Получали гомогенный додекамер (XIV) (1.5 мкмоль, 3.3%, исходя из 0.45 ммоль мономера (IIIa), в среднем 43% на цикл конденсация + деблокирование). Аналогично путем конденсации урацилсодержащих Вос-защищенного октамера и октамера с защищенной карбоксигруппой получали гомогенный гексадекамер (XV) (1 мкмоль, 2.2%, исходя из 0.45 ммоль мономера (IIIa), в среднем 40% на цикл конденсация + деблокирование). Масс-спектр (MALDI): додекамер (XIV) C<sub>132</sub>H<sub>170</sub>N<sub>48</sub>O<sub>49</sub> вычислено 3211.23, найдено *m/z* 3211.7 [*M* + H]<sup>+</sup>; гексадекамер (XV) C<sub>176</sub>H<sub>226</sub>N<sub>64</sub>O<sub>65</sub> вычислено 4275.63, найдено *m/z* 4277.5 [*M* + H]<sup>+</sup>.

**Капиллярный электрофорез** проводили на приборе P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis system (Beckman Coulter, США). Капилляр 30 см × 50 мкм, напряжение 25 кВ, УФ-детектор при  $\lambda$  254 нм. Перед началом работы ежедневно проводили промывку капилляра под давлением 0.14 МПа по следующей программе: 0.1 М АсОН, 5 мин; вода 1 мин; 0.1 М NaOH, 5 мин; вода, 1 мин; 7.5% PEI в буфере 25 мМ Трис/192 мМ Gly, pH 8.3, 5 мин. Разделение проводили по следующей программе: 0.14 МПа, 7.5% PEI в буфере 25 мМ Трис/192 мМ Gly, pH 8.3, 0.5 мин; 0.14 МПа, буфер 25 мМ Трис/192 мМ Gly, pH 8.3, 2 мин; ввод образца в течение 6 с при давлении 2.1 кПа; затем 25 кВ, обратная полярность электродов, по 3.4 кПа избыточного давления на оба конца капилляра, 15 мин. Концентрация образцов для анализа  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  М.

**Термостабильность комплементарных комплексов** изучали с использованием установки, созданной на основе хроматографа Милихром А4 (Эконова, Россия), с термостатируемой кюветой, как описано ранее [25]. Исследования проводили в буфере, содержащем 1М NaCl, 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 мМ EDTA, pH 7.2. Температуру плавления ( $T_{\text{max}}$ ) определяли как максимум первой производной кривой термической денатурации дуплексов. Точность определения температуры плавления составляла  $\pm 0.2^\circ\text{C}$ .

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках программы “Ведущие научные школы” (грант НШ-3185.2010.4) и при поддержке Междисциплинарных интеграционных проектов № 88, 60 и № 4 Президиума СО РАН, проекта Лаврентьевского конкурса молодежных проектов СО РАН, программы Президиума РАН “Молекулярная и Клеточная Биология” и гранта РФФИ 12-04-01454-а.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Antisense drug technology: principles, strategies, and application. 2nd ed. / Ed. Crooke S.T. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. Inc., 2008, 825 p.
- Bell N.M., Micklefield J. // ChemBioChem. 2009. V. 10. P. 2691–2703.
- Ефимов В.А., Аралов А.В., Чахмахчева О.Г. // Био-орган. химия. 2010. Т. 36. С. 725–746. [Efimov V.A., Aralov A.V., Chakhmakhcheva O.G. // Russ. J. Bioorg. Chem. Int. Ed. 2010. V. 36. P. 663–683.]
- Абрамова Т.В., Сильников В.Н. // Успехи хим. 2011. Т. 80. С. 452–476. [Abramova T.V., Silnikov V.N. // Russ. Chem. Rev. 2011. V. 80. P. 429–452.]
- Bill B.R., Petzold A.M., Clark K.J., Schimmenti L.A., Ekker S.C. // Zebrafish. 2009. V. 6. P. 69–77.
- Ouyang X., Shestopalov I.A., Sinha S., Zheng G., Pitt C.L.W., Li W.-H., Olson A.J., Chen J.K. // J. Amer. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 13255–13269.
- Swenson D.L., Warfield K.L., Warren T.K., Lovejoy C., Hassinger J.N., Ruthel G., Blouch R.E., Moulton H.M., Weller D.D., Iversen P.L., Bavari S. // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. P. 2089–2099.
- Mellbye B.M., Weller D.D., Hassinger J.N., Reeves M.D., Lovejoy C.E., Iversen P.L., Geller B.L. // J. Antimicrob. Chemother. 2010. V. 65. P. 98–106.
- Kang H., Chou P.-J., Johnson W.C., Jr., Weller D., Huang S.-B., Summerton J.E. // Biopolymers. 1992. V. 32. P. 1351–1363.
- Thiviyannathann V., Vyasovkina K.V., Gozansky E.K., Bichenkova E., Abramova T.V., Luxon B.A., Lebedev A.V., Gorenstein D.G. // Biochemistry. 2002. V. 41. P. 827–838.
- Abramova T.V., Kassakin M.F., Silnikov V.N. // Ind. J. Chem. 2009. V. 48B. P. 1721–1726.
- Abramova T.V., Kassakin M.F., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Silnikov V.N. // Bioorg. Chem. 2007. V. 35. P. 258–275.
- Chakhmakhcheva O., Andrianov M., Buryakova A., Choob M., Efimov V. // Nucleosides Nucleotides. 1999. V. 18. P. 1427–1428.
- Касакин М.Ф., Абрамова Т.В., Сильников В.Н. // Биоорг. химия. 2011. Т. 37. № 6. С. 830–835. [Kassakin M.F., Abramova T.V., Silnikov V.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. Int. Ed. 2011. V. 37. P. 752–757.]
- Christensen L., Fitzpatrick R., Gildea B., Petersen K.H., Hansen H.F., Koch T., Egholm M., Buchardt O., Nielsen P.E., Coull J., Berg R.H. // J. Pept. Sci. 1995. V. 1. P. 175–183.
- Guibe-Jampel E., Wakselman M. // Synthetic Comm. 1982. V. 12. P. 219–223.
- Анципович С.И. // Успехи химии. 2002. Т. 71. С. 81–96. [Antsyrovich S.I. // Russ. Chem. Rev. 2002. V. 71. P. 71–83.]
- Tan T.H.S., Worthington R.J., Pritchard R.G., Morral J., Micklefield J. // Org. Biomol. Chem. 2007. V. 5. P. 239–248.
- Park M., Bruice T.C. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 3488–3491.
- Gokhale S.S., Kumar V.A. // Org. Biomol. Chem. 2010. V. 8. P. 3742–3750.
- Cuttman A., Cohen A.S., Heiger D.N., Karger B.L. // Anal. Chem. 1990. V. 62. P. 137–141.
- Towns J.K., Regnier F.E. // J. Chromatogr. 1990. V. 516. P. 69–78.
- Córdova E., Gao J., Whitesides G.M. // Anal. Chem. 1997. V. 69. P. 1370–1379.
- SantaLucia J. Jr., Hicks D. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2004. V. 33. P. 415–440.
- Lokhov S.G., Pyshnyi D.V. // FEBS Lett. 1997. V. 420. P. 134–138.

## Synthesis and Properties of Methylene Carboxamide Mimetics of Nucleic Acids Based on Morpholine Nucleosides

T. V. Abramova\*, #, M. F. Kassakin\*, Yu. V. Tarasenko\*, \*\*, A. A. Lomzov\*,  
V. V. Koval\*, D. V. Pyshnyi\*, and V. N. Silnikov\*

#Phone: +7 (383) 363-51-83; fax: +7 (383) 363-51-82; e-mail: [abramova@niboch.nsc.ru](mailto:abramova@niboch.nsc.ru)

\*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS,  
Lavrent'ev Ave 8, Novosibirsk, 630090 Russia

\*\*Novosibirsk State University, Pirogova st. 2, Novosibirsk, 630090 Russia

Uracyl and adenine containing oligocarboxamide mimetics of nucleic acids based on morpholine nucleosides (MorGly) are synthesized using peptide chemistry methods. Conditions for an analysis of homogeneity of protonated at physiological pH oligomers using a capillary electrophoresis are proposed. Studies of thermostability of complementary complexes formed by MorGly oligomers revealed that melting temperature dramatically depends on heterocyclic base composition (uracyl or adenine). Cooperative interactions realized at junctions in tandem complexes give more contribution to the thermostability in the case of complexes formed by modified oligomers than native oligodeoxyriboadenilates. Adenine containing MorGly oligomers form more stable complexes with poly(U) than native oligodeoxyriboadenilate of the same length. Complexes formed by modified oligomers with polyribonucleotides are more stable in compare with polydeoxyribonucleotide.

*Keywords: oligonucleotide analogues, NA mimetics, morpholine nucleosides, capillary electrophoresis.*