



УДК 577.113.6

ПЕПТИДО-НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ ФОСФОНАТНЫЕ АНАЛОГИ. II*. СИНТЕЗ ГИБРИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТКИ СЕРИНА И 4-ГИДРОКСИПРОЛИНА, И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

© 1999 г. В. А. Ефимов[#], А. А. Бурякова, М. В. Чуб, О. Г. Чахмаччева

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 22.12.98 г. Принята к печати 12.04.99 г.

Описан синтез ДНК-миметиков, представляющих собой гибриды пептидо-нуклеиновых кислот (PNA) и фосфонатных аналогов пептидо-нуклеиновых кислот (рPNA) с производными гидроксиаминокислот: L-серина и L-4-транс-гидроксипролина. Разработаны preparative методы получения мономеров и некоторых гетеродимеров на основе серина и гидроксипролина. С помощью твердофазного автоматического синтеза получены соответствующие олигомеры-миметики, в том числе пиренсодержащие производные. Исследована способность полученных аналогов НК специфически гибридизоваться с комплементарными цепями ДНК и РНК. Показано, что гомотиминовые гибриды, состоящие из мономеров PNA или рPNA, чередующихся с мономерами на основе гидроксипролина, образуют очень прочные комплексы с комплементарными олигонуклеотидами, температуры плавления которых близки к температурам плавления аналогичных комплексов, образованных PNA.

Ключевые слова: олигонуклеотиды; ДНК-миметики; пептидо-нуклеиновые кислоты; фосфонатные аналоги; гибриды с гидроксипролином и серином; комплексообразование.

Одна из потенциальных сфер применения синтетических олигонуклеотидов – использование в качестве лекарственных средств нового поколения, основана на их способности специфически ингибировать экспрессию генов и репликацию вирусов. С целью улучшения физико-химических и биологических свойств природных фрагментов ДНК, в частности увеличения сродства к комплементарным последовательностям и устойчивости к действию нуклеаз, было предложено большое число аналогов нуклеиновых кислот [2]. Внимание широкого круга исследователей уже несколько лет привлекают пептидные аналоги нуклеиновых кислот (PNA), состоящие из ахиральных мономерных субъединиц на основе N-(2-аминоэтил)глицина и несущие в боковых цепях гетероциклические основания НК, ввиду их высокого сродства к ДНК и РНК, а также устойчивости в различных биологических системах [3]. Однако, несмотря на прекрасные гибридизационные свойства, PNA не нашли до

сих пор широкого применения из-за низкой растворимости в воде, склонности к самоагрегации, неспособности активировать РНКазу Н и плохого проникновения сквозь клеточные мембранны [4, 5]. Для улучшения растворимости PNA был разработан ряд их модификаций [5–9], в том числе нами был предложен новый класс ДНК-миметиков на основе N-(2-гидроксиэтил)- или N-(2-аминоэтил)фосфоноглицина, представляющих собой фосфонатные аналоги PNA (рPNA) (рис. 1) [10–13].

Было показано, что олигомеры рPNA полностью устойчивы к гидролизу эндо- и экзонуклеазами, хорошо растворимы в воде и способны специфически гибридизоваться с комплементарными последовательностями НК, хотя температуры плавления образующихся при этом комплексов ниже, чем у подобных комплексов, образованных PNA-олигомерами [13]. Поскольку молекулы PNA и рPNA – изостеры, логическим продолжением этих исследований стал синтез химерных олигомеров, содержащих мономеры обоих типов [1, 13, 14]. Полученные нами химеры содержали все четыре гетероциклических основания ДНК и состояли либо из чередующихся сегментов, содержащих по нескольку мономерных остатков PNA или рPNA, либо из чередующихся мономеров PNA и рPNA. Было установлено, что химеры PNA-рPNA обладают хорошими гибридизационными свойствами, сочетающимися с хорошей растворимостью в воде, и, следовательно,

* Сообщение I см. [1].

Сокращения: DBU – 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундек-7-ен; DCA – дихлоруксусная кислота; DMTr – 4,4'-диметокситритил; FPLC – быстрая жидкостная хроматография; НурNA и СерNA – аналоги пептидо-нуклеиновых кислот на основе 4-гидроксипролина и серина; MMTr – 4-монометокситритил; PNA – пептидо-нуклеиновые кислоты; рPNA – фосфонатные аналоги пептидо-нуклеиновых кислот; Руг – пирен; TPS-NT (или -Cl) – 2,4,6-триизопропилбензольсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазолид (или -хлорид).

[#] Автор для переписки (e-mail: eva@ibch.siobc.ras.ru).

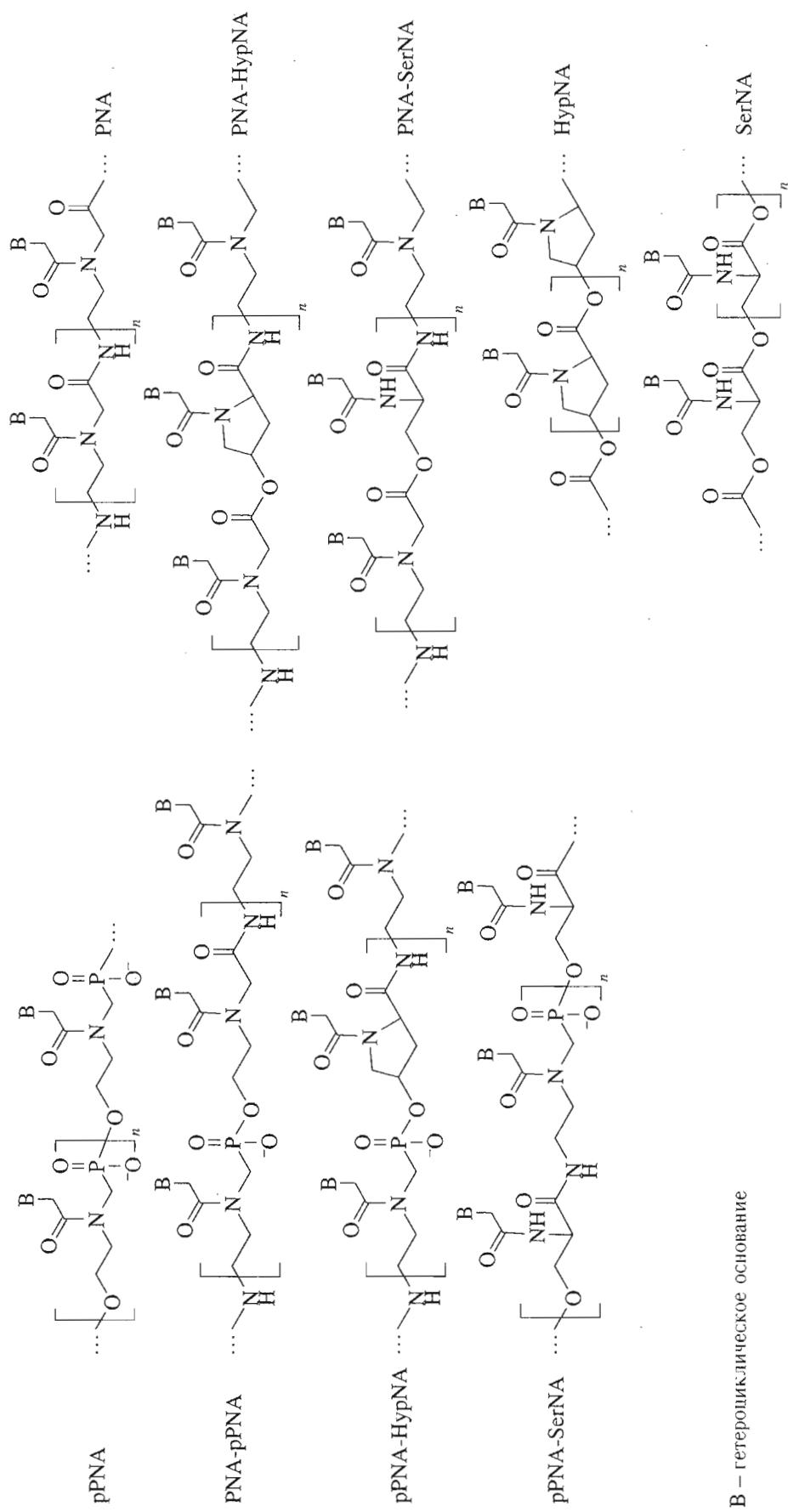


Рис. 1. Структуры ДНК-миметиков: пептидо-нуклеиновых кислот (PNA), фосфонатных аналогов пептидо-нуклеиновых кислот (pPNA), аналогов – производных 4-гидроксигуанилина (HypNA) и серина (SerNA), а также их гибридов различного типа.

B – гетероциклическое основание

улучшенными по сравнению с PNA и pPNA характеристиками [1, 13, 14].

Недавно появилось сообщение о синтезе гетероаналога ДНК из традиционных PNA-мономеров и мономеров на основе *L*-4-транс-аминопролина [15]. Было показано, что эти гибриды образуют с комплементарными последовательностями НК очень прочные комплексы, температуры плавления которых даже несколько выше, чем температуры плавления комплексов, образованных самими PNA. В этой связи было интересно проверить свойства подобных производных, полученных из более доступных гидроксиаминокислот.

В данной работе нами осуществлен синтез ряда олигомеров-миметиков ДНК, содержащих остатки *L*-серина и *L*-4-транс-гидроксипролина, несущих в боковых цепях остаток тимина (рис. 1), и изучены их гибридизационные свойства.

Получение мономерных и димерных синтонов на основе серина и 4-гидроксипролина

Производные *L*-4-транс-гидроксипролина и *L*-серина вводили в олигомеры-миметики в виде димеров типа (I) или (II) (рис. 2), которые получали из соответствующих мономеров (Vа) и (VI),

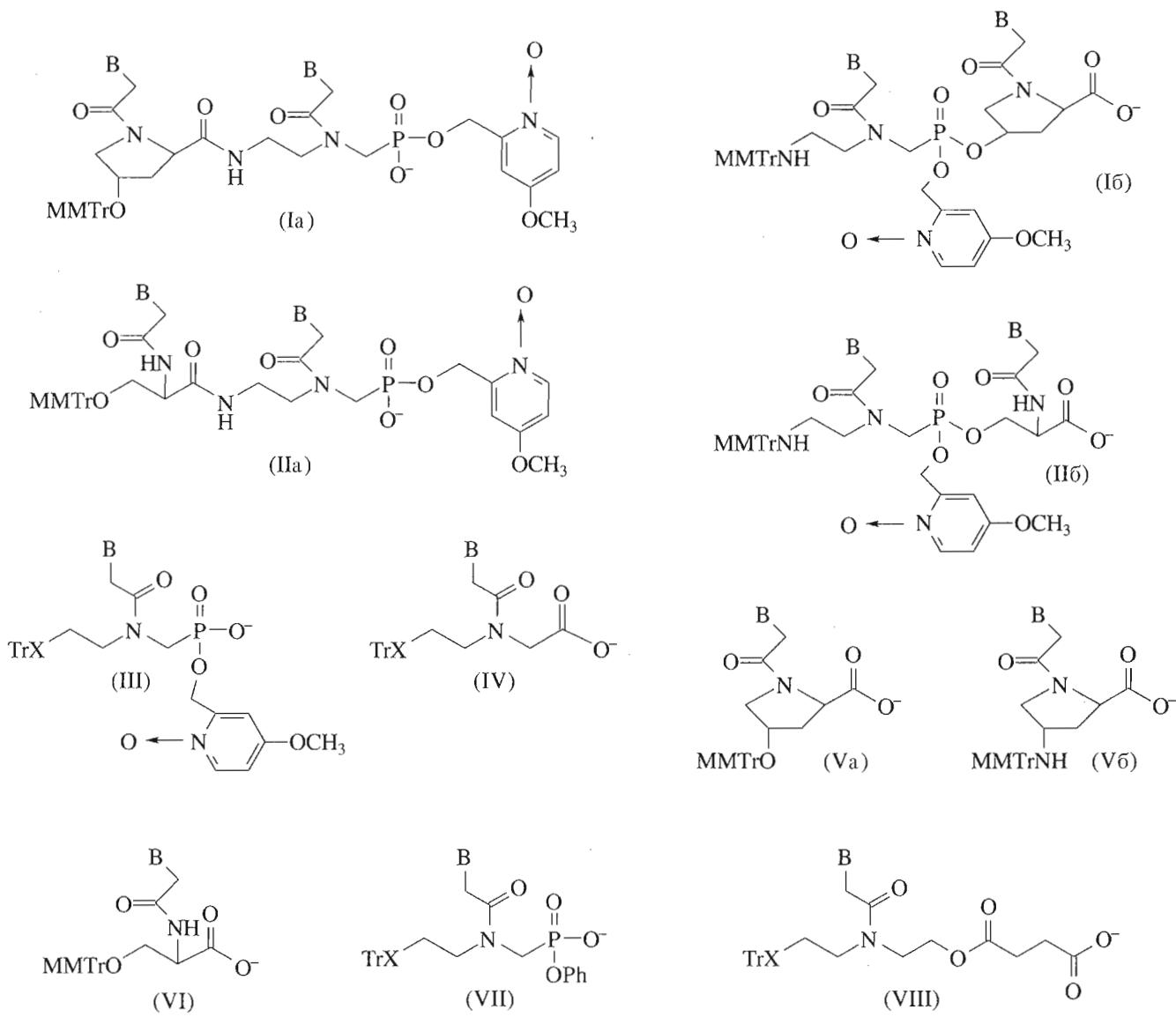


Рис. 2. Структуры мономерных и димерных синтонов, использованных для синтеза ДНК-миметиков.

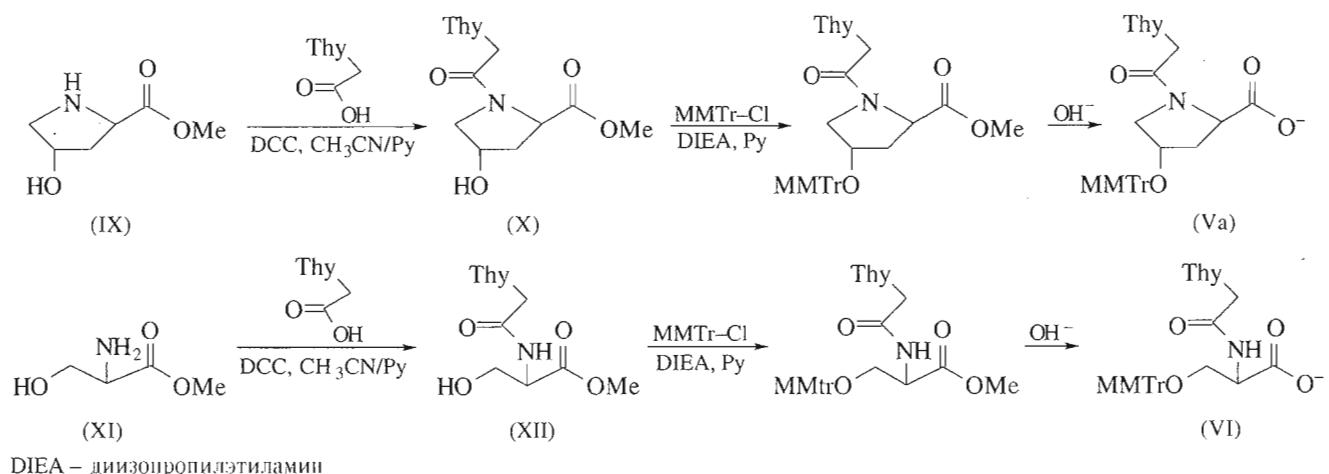


Схема 1.

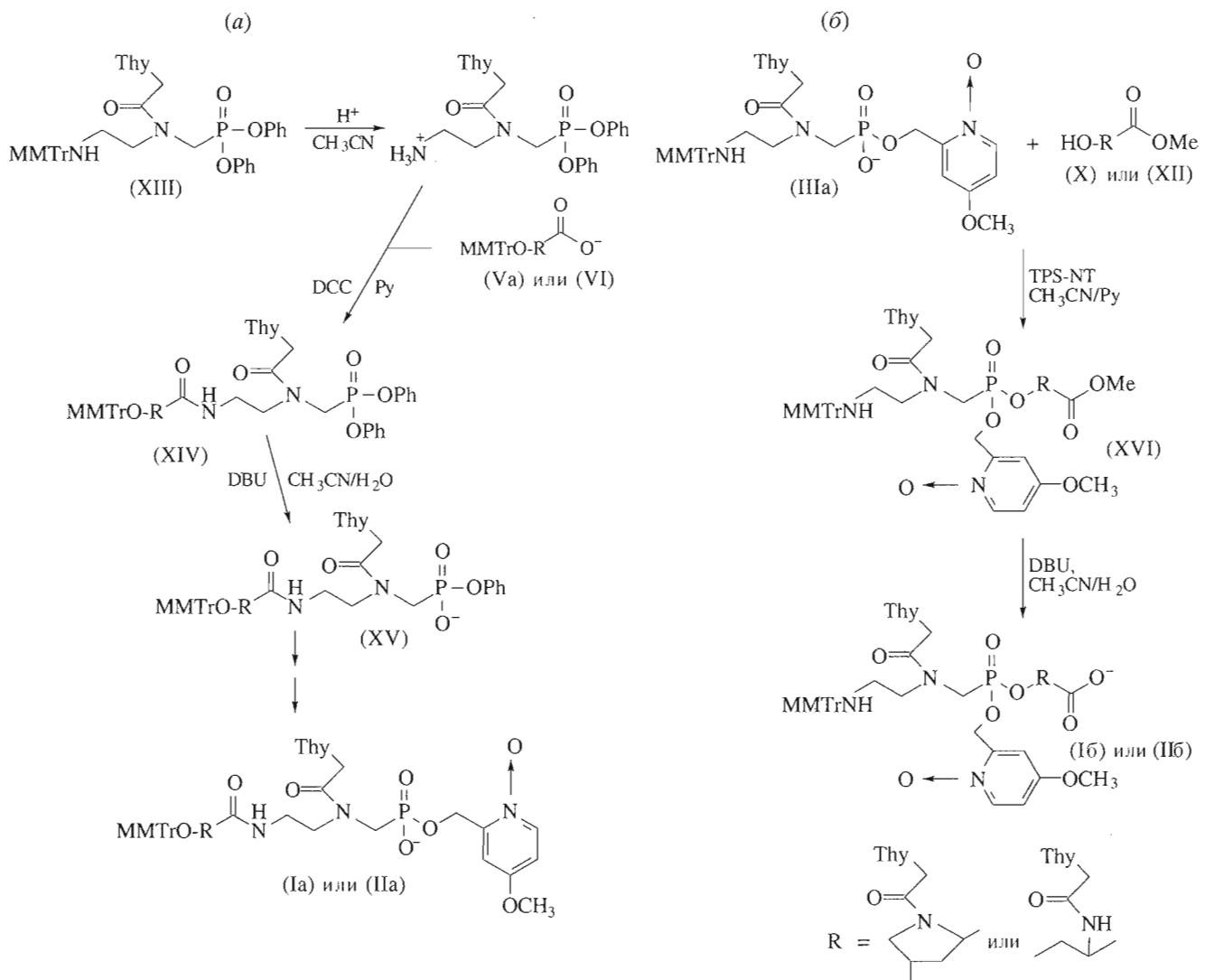


Схема 2.

Таблица 1. Реагенты и условия отдельных стадий твердофазного синтеза олигомеров*

Операция	Реагенты и растворители	Время, мин
<i>1. Образование фосфонодиэфирной связи</i>		
Детритилирование	3% DCA в дихлорметане	1.5–3.0
Промывка	Ацетонитрил	0.5
Промывка	Ацетонитрил–пиридин (4 : 1)	3.0
Конденсация	0.05 М <i>P</i> -компонент; 0.15 М TPS-Cl в CH ₃ CN–Py (4 : 1)	5.0
Промывка	Ацетонитрил	1.0
Кэплинг	Ac ₂ O–1-метилимидазол–CH ₃ CN–Py (1 : 1 : 6 : 2)	1.0
Промывка	Дихлорметан	1.5
<i>2. Образование амидной связи</i>		
Детритилирование	3% пентафторфенол в дихлорметане	3.0
Промывка	0.2 М дизопропилэтиламин в дихлорметане	0.5
Промывка	Ацетонитрил–пиридин (4 : 1)	1.0
Конденсация	0.05 М COOH-компонент**, 0.06 М TPS-NT, 0.2 М 1-метилимидазол в CH ₃ CN–Py (2 : 1)	10.0
Промывка	CH ₃ CN–Py (4 : 1)	0.5
Кэплинг	Ac ₂ O–1-метилимидазол–CH ₃ CN–Py (1 : 1 : 6 : 2)	1.0
Промывка	Дихлорметан	1.0
<i>3. Образование сложноэфирной связи</i>		
Детритилирование	3% DCA в дихлорметане	1.5
Промывка	Ацетонитрил	0.5
Промывка	Ацетонитрил–пиридин (4 : 1)	1.0
Конденсация	0.05 М COOH-компонент, 0.06 М TPS-Cl, 0.2 М 1-метилимидазол в CH ₃ CN–Py (2 : 1)	5.0
Промывка	CH ₃ CN–Py (4 : 1)	0.5
Кэплинг	Ac ₂ O–1-метилимидазол–CH ₃ CN–Py (1 : 1 : 6 : 2)	1.0
Промывка	Дихлорметан	1.0

* Реакции проводили на носителе (30 мг), содержащем около 1 мкмоль тритильных групп.

** Перед конденсацией карбоксильный компонент предактивировался смешиванием с TPS-NT и 1-метилимидазолом.

синтезированных как показано на схеме 1. Исходными соединениями в синтезе производных (**Va**) и (**VI**) являлись метиловые эфиры аминокислот (**IX**) и (**XI**), в которые по аминогруппе вводилось гетероциклическое основание тимин действием тимин-1-метиленкарбоновой кислоты в присутствии конденсирующего реагента, как это было описано ранее для PNA- и pPNA-мономеров [1, 6, 13]. Затем свободную гидроксильную группу монометокситритилировали с последующим омылением сложноэфирной защитной группы. Полученные таким образом мономеры (**Va**) и (**VI**) имели защитные группы, совместимые с условиями, используемыми для образования как фосфонодиэфирной, так и амидной связей.

Мономеры (**Va**) или (**VI**) превращали в димерные синтоны типа (**Ia**) и (**IIa**) конденсацией с дифениловым эфиром pPNA-мономера (**XIII**) (схема 2a), синтез которого был описан ранее [13]. В качестве конденсирующего реагента для образования амидной связи использовался дициклогексилкарбодиимид. Введение алкильной *O*-катализитической *P*-защитной группировки в димеры

проводилось в три стадии, как это было описано ранее [13]. Синтез димеров типа (**Ib**) и (**IIb**), имеющих на концах амино- и карбоксильную группировки, проводился аналогично тому, как это было описано нами ранее для PNA-pPNA-димеров (схема 2б) [1, 13].

Синтез гетероолигомеров

Твердофазный синтез олигомеров-миметиков, содержащих фосфоноэфирные и амидные связи, осуществлялся на носителях на основе макропористых стеклянных шариков, функционализированных производным (**VIII**), как описано ранее [1, 13].

Для создания сложноэфирной связи брали 5-кратный избыток мономерного или димерного синтона в растворе относительно первого звена, присоединенного к носителю. В качестве растворителя использовали смесь ацетонитрила и пиридина. Реакции конденсации проводили в присутствии TPS-Cl и 1-метилимидазола, как это было описано нами ранее [16] (табл. 1). Синтез олигомеров, содержащих сложноэфирные связи, проводился на

носителе, функционализированном мономером типа (**VII**), присоединенным к твердой фазе через алкилсульфонилэтильную группу [16] (схема 3). Перед каждой следующей стадией наращивания цепи

ди- или монометокситритильную группу с концевой OH-группы олигомера на носителе удаляли действием раствора 3–6% дихлоруксусной кислоты в дихлорметане, а монометокситритильную

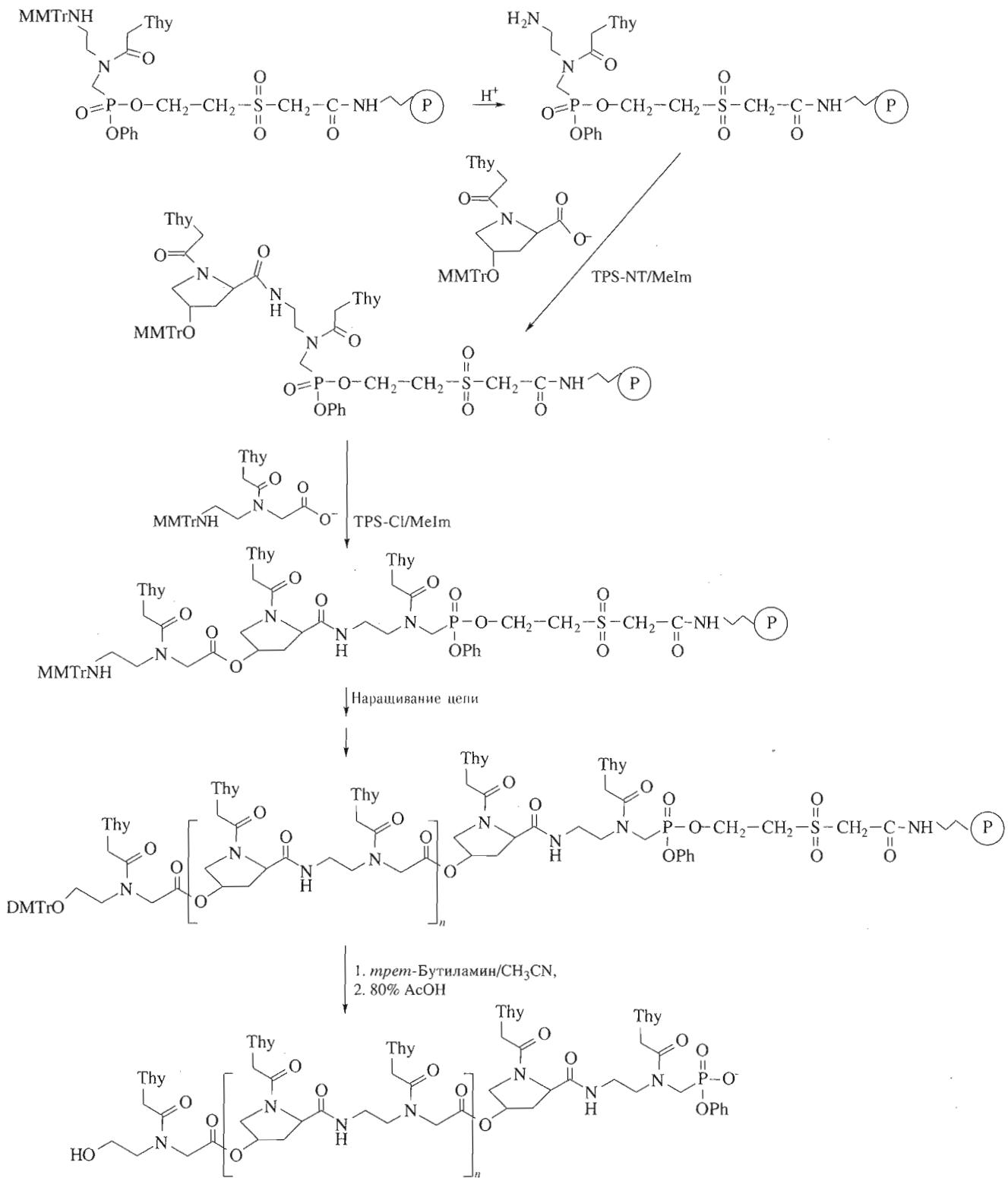


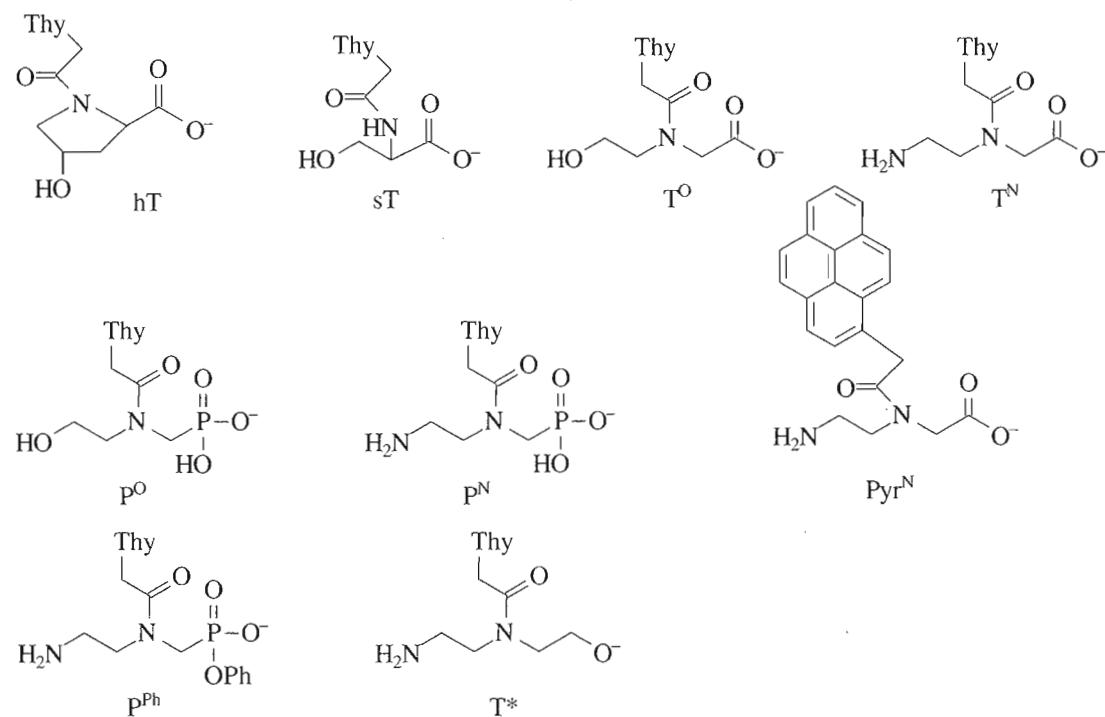
Схема 3.

Таблица 2. Температуры плавления комплексов, образованных гомотиминовыми олигомерами с поли-dA или поли-gA-матрицами

Номер	Тип олигомера	Структура	$T_m(\Delta T_m^a)$, °C	
			poly(dA)	poly(rA)
1	ДНК	dT ₁₆	45	43
2	ДНК-HypNA-pPNA	(dT) ₈ -hT-(P ^N -hT) ₃ -T*	19, 48	21, 47
3	ДНК-HypNA-pPNA	(dT) ₈ -hT-P ^N -P ₅ ^O -T*	20, 35	22, 33
4	pPNA-HypNA-PNA	(P ^O) ₈ -hT-T ₆ ^N -T*	37, 53	31, 59
5	ДНК-HypNA-PNA	(dT) ₈ -hT-T ₆ ^N -T*	18, 54	20, 58
6	pPNA	P ₁₅ ^O -T*	52 (+7)	41 (-2)
7	PNA-pPNA	Ac-(T ^O -P ^N) ₇ -T ^O -T*	68 (+23)	60 (+17)
8	pPNA-HypNA	(hT-P ^N) ₇ -hT-T*	83 (+38)	77 (+34)
9	pPNA-SerNA	(sT-P ^N) ₇ -sT-T*	40 (-5)	36 (-7)
10	PNA	Ac-T ₁₅ ^N -T*	85 (+40)	82 (+39)
11	PNA-HypNA	(hT-T ^N) ₇ -hT-P ^{Ph}	81 (+36)	78 (+35)
12	PNA-SerNA	(sT-T ^N) ₇ -sT-P ^{Ph}	56 (+11)	53 (+10)
13	pPNA-HypNA	P ^O -(P ^O -hT-P ^N) ₄ -hT-T*	66 (+21)	58 (+15)
14	PNA-pPNA-HypNA	Ac-Pyr ^N -P ^N -(P ^O -hT-P ^N) ₄ -hT-T*	73 (+28)	66 (+23)
15	PNA-pPNA-HypNA	Ac-Pyr ₂ ^N -P ^N -(P ^O -hT-P ^N) ₄ -hT-T*	79 (+34)	74 (+31)
16	pPNA-HypNA	(hT-P ^N -hT) ₅ -T*	52 (+7)	48 (+5)
17	HypNA	hT ₁₅ -P ^{Ph}	<10	<10
18	SerNA	sT ₁₅ -P ^{Ph}	<5	<5

^a – Разница между температурами плавления комплекса, образованного олигодезоксирибонуклеотидом dT₁₆ с poly(A)-матрицей, и комплекса, образованного миметиком (не приведена для комплексов, имеющих две точки перехода).

Условные обозначения для использованных мономеров:



N-защитную группу – действием 3% раствора пентафторфенола в дихлорметане [13].

Во всех случаях выходы на отдельных стадиях наращивания составляли 95–98%. Олигомеры, содержащие сложноэфирные связи, сначала отщепляли от носителя действием *tert*-бутиламина в течение 1–2 ч при комнатной температуре. Эта мягкая обработка оказалась вполне достаточной для количественного прохождения реакции β -эlimинирования при удалении олигомера с алкилсульфонилэтильного носителя и практически не затрагивала сложноэфирных связей между мономерами в цепи. Затем удаляли концевую тритильную группу действием 80% уксусной кислоты. Очистку олигомеров осуществляли анионообменной или обращенно-фазовой FPLC, гомогенность отрицательно заряженных соединений проверяли также электрофорезом в полиакриламидном геле.

Таким образом, был осуществлен синтез ряда миметиков, структуры которых в общем виде показаны на рис. 1, а последовательности мономеров приведены в табл. 2. Один из типов полученных нами гибридов содержал pPNA-мономеры, чередующиеся с HypNA- или SerNA-мономерами и соединенные поочередно фосфономоноэфирной и амидной связью (pPNA–HypNA, 1 : 1 или pPNA–SerNA, 1 : 1) (8), (9). Другие представляли собой химеры, состоящие из сегментов pPNA, каждый из которых был образован несколькими мономерами, и отдельных вкраплений HypNA- (13), (16) или SerNA-остатков в различных участках цепи. Также были получены PNA-HypNA- и PNA-SerNA-гетероолигомеры, содержащие чередующиеся амидные и сложноэфирные связи (11), (12). В качестве контрольных соединений использовались гомогенные pPNA- (6) и PNA-олигомеры (10), PNA-pPNA-гибриды (7) [12–14], а также полиэфирные олигомеры, состоящие только из HypNA- (17) или SerNA-мономеров (18). Помимо этого, были получены олигомеры, имеющие на концах цепи один (14), два (15) или три синтона с остатком пирена вместо гетероцикла (14), (15). Кроме того, был осуществлен синтез химерных молекул, которые состояли из сегментов, образованныхическими однотипными мономерами (PNA, pPNA, ДНК) (3)–(5) или димерами (pPNA–HypNA) (2) (табл. 2). В случае сегментарных гибридов ДНК-pPNA, pPNA-PNA и ДНК-PNA (2)–(5) разнотипные участки были соединены остатком HypNA, как линкером.

Гибридизационные свойства ДНК-миметиков

Оценка способности полученных нами миметиков связываться с комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот проводилась сравнением температур плавления образованных ими комплексов с температурами плавления комплексов, образованных соответ-

ствующими фрагментами ДНК, pPNA, PNA и PNA-pPNA-гибридами. Было обнаружено увеличение стабильности комплексов между гибридами pPNA-HypNA (8) и ДНК (РНК)-матрицами по сравнению с аналогичными комплексами, образованными pPNA (6) и PNA-pPNA-гибридом (7) (табл. 2). При этом стабильность комплексов возрастала с увеличением числа остатков HypNA-мономеров в цепи и приближалась к стабильности комплексов PNA с ДНК (РНК) при наличии в молекуле 50% этих остатков, чередующихся с остатками pPNA (рис. 3а). При дальнейшем увеличении содержания HypNA-мономеров в цепи стабильность комплексов начинала опять падать. В то же время подобные pPNA-SerNA-гибриды (12), содержащие чередующиеся мономеры, давали менее прочные комплексы с температурами плавления, близкими к температурам плавления соответствующих комплексов, образованных однородными pPNA-олигомерами и природными олигонуклеотидами.

Комpleксы, образованные oligo(A)-нуклеотидами с гибридами сегментарного типа (2)–(5), содержащими участки, составленные из нескольких мономеров или димеров, в частности нуклеотидов (ДНК-сегмент), pPNA- или PNA-мономеров и pPNA-HypNA-димеров, обладали меньшей термической устойчивостью, чем олигомеры, составленные из чередующихся pPNA- и HypNA-мономеров (8). Подобно ранее описанным сегментарным ДНК-pPNA-гибридам [1, 12], их кривые плавления содержали два перегиба (перехода), соответствующие плавлению участков разного типа (табл. 2).

Аналогичные результаты были получены при изучении свойств гибридов (11) и (12), состоящих из PNA- и HypNA- или SerNA-мономеров и содержащих чередующиеся амидные и сложноэфирные связи. Эти соединения оказались достаточно стабильны в водных растворах при pH < 8 и медленно деградировали при pH > 8.5 вследствие расщепления сложноэфирных связей. В то же время олигомеры (17) и (18), представляющие собой полиэфирные аналоги и составленные исключительно из HypNA-(или SerNA)-мономеров, оказались неспособными образовывать прочные комплексы с комплементарными ДНК или РНК, что согласуется с данными работы [15] для производных 4-аминопролина.

Титрование poly(A)-фрагментов ДНК или РНК гомотиминовыми миметиками показало, что последние образовывали с комплементарными матрицами триплексы состава (миметик)₂/ДНК(РНК) (рис. 3б).

Введение в один из концов цепи олигомера-миметика остатков пирена, как и в случае рассмотренных ранее представителей pPNA-олигомеров и PNA-pPNA-гибридов [1], приводило к повышению

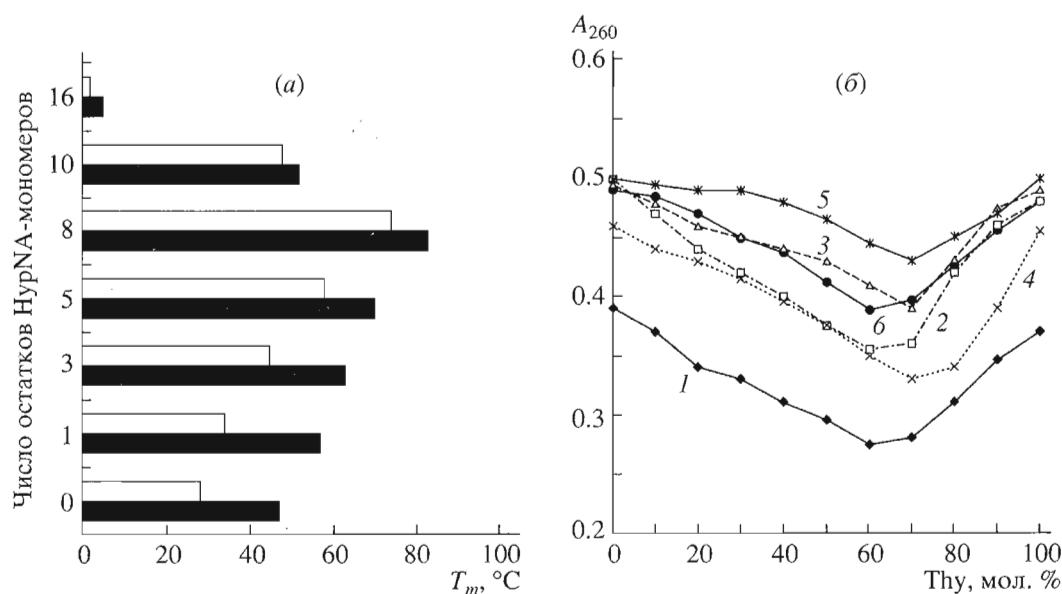


Рис. 3. Гибридизационные свойства олигомиметиков. (а) – Сравнение температур плавления комплексов 16-звенных гомотиминовых гибридов pPNA-HypNA, содержащих различное количество остатков HypNA-мономеров, равномерно распределенных по длине цепи, с комплементарными poly(dA)- (черные столбики) или poly(rA)- (светлые столбики) матрицами. (б) – Кривые титрования комплексов, образованных dA₁₆ и Thy₁₆-миметиками: pPNA-HypNA (8) – (1), pPNA-SerNA (9) – (2), pPNA (6) – (3), PNA-pPNA (7) – (4), PNA (10) – (5) и PNA-HypNA (11) – (6), в 0.1 M NaCl/0.02 M Трис-HCl (pH 7)/0.01 M MgCl₂.

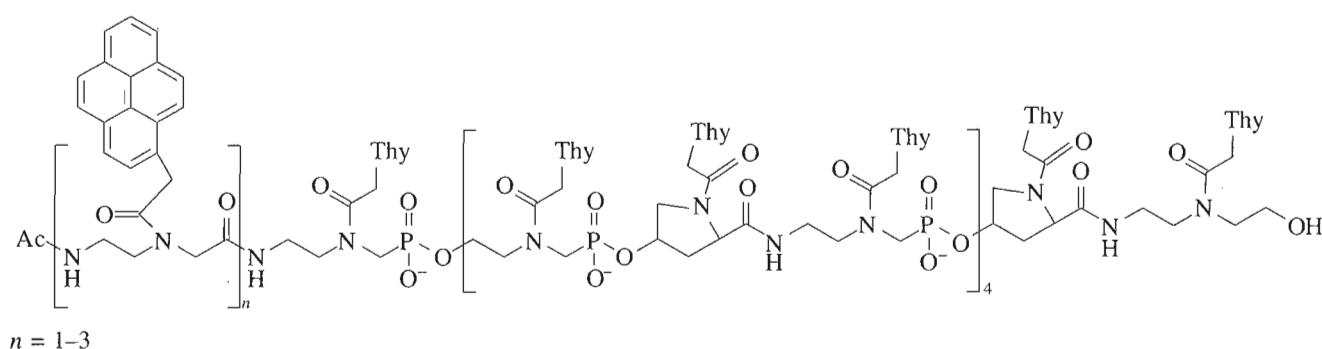
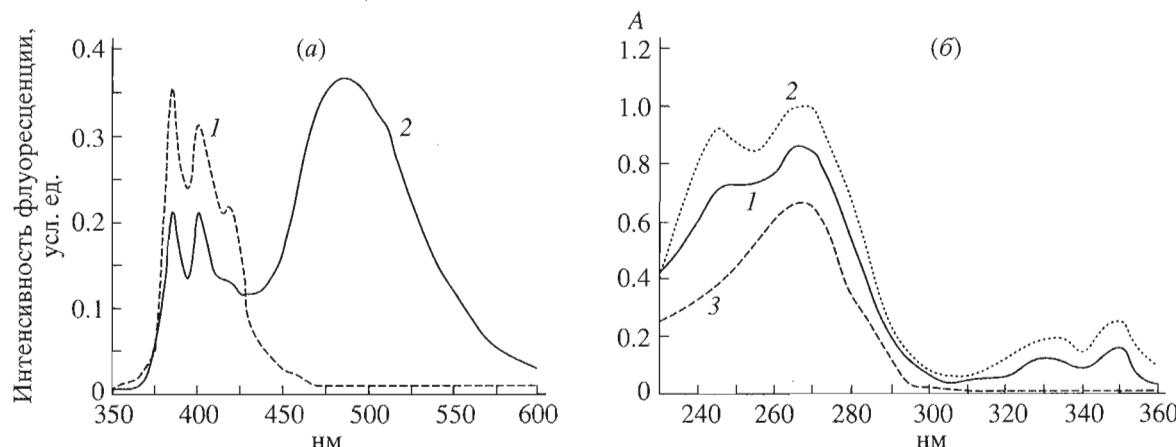


Рис. 4. Структура и спектральные свойства pPNA-HypNA (2 : 1)-олигомеров-миметиков, содержащих остатки пирена. (а) – Флуоресцентные спектры 0.1 мкМ водных растворов олигомеров (14) и (15), содержащих соответственно один (1) и два (2) остатка пирена, в 0.1 M NaCl/0.02 M Трис-HCl (pH 7) при 340 нм; (б) – УФ-спектры водных растворов олигомеров (14) и (15) (кривые 1 и 2) и аналогичного олигомера (13), не содержащего пирен (3).

температуры плавления его комплексов с НК на несколько градусов. Изучение УФ- и флуоресцентных спектров водных растворов олигомеров, имеющих 2–3 последовательно присоединенных пиреновых мономера, показало наличие значительной эксимерной флуоресценции как олигомера-миметика, так и комплексов, образованных им с НК. Последнее выражается в появлении в спектре большого пика с максимумом при 485 нм, соответствующего эксимерной эмиссии (рис. 4). Кроме того, эксимерная флуоресценция зон как пиренсодержащих олигомеров, так и их дуплексов и триплексов с комплементарными олигонуклеотидами прекрасно наблюдается при просматривании в УФ-свете полиакриламидных гелей после электрофореза. Следует отметить, что полученные данные иллюстрируют возможность использования пиренсодержащих миметиков в качестве гибридизационных проб при скрининге ДНК, а также в виде репортерных групп.

Таким образом, ввиду присущих им физико-химических характеристик гибриды pPNA-НурNA и PNA-НурNA, содержащие производные *L*-4-транс-гидроксипролина, являются наиболее перспективными из всех описанных в данной работе ДНК-миметиков (по сравнению с PNA, pPNA и PNA-pPNA-гибридами) для дальнейшего их изучения как потенциальных антисенс- или антигенных реагентов в плане возможного использования в терапевтических целях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались органические растворители и реагенты фирмы Merck (ФРГ) и 1-пиренилуксусная кислота (Aldrich) без дополнительной очистки. ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектры снимали в CDCl_3 на спектрометре Bruker WM500 (рабочая частота ^{31}P 202.48 MHz). Химические сдвиги приведены в шкале δ . Спектры флуоресценции снимали при комнатной температуре и длине волн возбуждения 340 нм на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Beckman-35. ТХС проводили на пластинках Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck) в системе растворителей хлороформ–метанол, 9 : 1 (А) или хлороформ–метанол–триэтиламин, 8.4 : 1.5 : 0.1 (Б). Для колоночной хроматографии использовали Silica Gel 60 (Merck).

Синтез мономеров pPNA (III) и PNA (IV) был описан нами ранее [1, 10, 13]. Пиренсодержащие мономеры синтезировали аналогично пиридинсодержащим мономерам с использованием DCC для присоединения пиренуксусной кислоты к оству [1]. Структуры всех описанных в данной работе мономеров подтверждались данными ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектроскопии.

4-О-Монометокситритил-*N*-(тимин-1-илацетил)-*L*-гидроксипролин (мономер (Vа)) получали исходя из гидрохлорида метилового эфира 4-гидроксипролина (1.82 г, 10 ммоль), который растворяли в 40 мл смеси пиридин–ацетонитрил (1 : 1), содержащей 1.4 мл (10 ммоль) триэтиламина, и при перемешивании прибавляли тимин-1-уксусную кислоту (2.02 г, 11 ммоль) и DCC (2.47 г, 12 ммоль). Через 3 ч реакцию терминировали прибавлением 2 мл воды и смесь оставляли при комнатной температуре на ночь. Выпавший осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, раствор упаривали до масла. Остаток высушивали упариванием с пиридином (2 × 30 мл), растворяли в 40 мл пиридина и прибавляли дизопропилэтамин (1.72 мл, 10 ммоль) и монометокситритилхлорид (4.01 г, 13 ммоль). Реакционную смесь нагревали 1 ч при 70°C, затем охлаждали до 0°C и прибавляли 50 мл 2 М раствора KOH в смеси метанол–вода (1 : 1). Через 0.5 ч к реакционной смеси прибавляли дауэкс-50 (RyH^+) для нейтрализации щелочи. Смolu отфильтровывали, промывали 50% водным пиридином, к фильтрату добавляли триэтиламин (2.1 мл, 15 ммоль) и смесь упаривали до масла, которое высушивали отгонкой с толуолом. Продукт выделяли хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации метанола (0 → 8%) в дихлорметане, содержащем 1% триэтиламина. Выход 6.5 ммоль (65%), R_f 0.28 (А). m/z 570 ($M + H$)⁺: $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$; ^1H -ЯМР: 1.20 (т, 9H, CH_3 , NHEt₃); 1.8 (с, 3H, CH_3 , Thy); 1.95 и 2.15 (м, 2H, H3, Pro); 2.95 (кв, 6H, CH_2 , NHEt₃), 2.95 и 3.15 (2дд, 2H, H5, Pro); 3.75 (с, 3H, OCH₃, MMTr); 4.0 (м, 1H, H4, Pro); 4.25 (м, 1H, H2, Pro); 4.4–4.5 (2с, ротамеры 2H, N-CO-CH₂); 6.75–7.40 (м, 15H, H, Ar и H6, Thy).

О-Монометокситритил-*N*-(тимин-1-илацетил)-*L*-серин (мономер (VI)) получали аналогично мономеру (Vа) исходя из гидрохлорида метилового эфира серина (1.56 г, 10 ммоль). Выход 7.1 ммоль (71%). R_f 0.25 (А). m/z 544 ($M + H$)⁺: $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7$; ^1H -ЯМР: 1.20 (т, 9H, CH_3 , NHEt₃); 1.82 (с, 3H, CH_3 , Thy); 2.95 (кв, 6H, CH_2 , NHEt₃), 3.35 (м, 2H, CH_2 , MMTrO); 3.75 (с, 3H, OCH₃, MMTr); 4.16 (м, 1H, HOOC-CH-CH₂); 4.3 (дд, 2H, N-CO-CH₂); 6.75–7.60 (м, 15H, H, Ar и H6, Thy); 9.3 (ущ. с, 1H, NH).

Димеры (Iа) и (IIа). Тиминсодержащий дифенилfosфонат (XIII) (2 ммоль) [13] в течение 15 мин обрабатывали пикриновой кислотой (2.1 ммоль) в 10 мл 5% водного ацетонитрила для удаления монометокситритильной группы. Реакционную смесь упаривали в вакууме досуха и повторно упаривали с ацетонитрилом (15 мл × 2). Остаток растворяли в абр. пиридине (8 мл) и прибавляли мономер (Vа) или (VI) (1.9 ммоль), растворенный в 8 мл пиридина, а затем DCC (2.5 ммоль). Выдерживали 1 ч при комнатной температуре и прибавляли 2 мл воды. Затем к раствору

ру соединения (**XIV**) прибавляли DBU (1.25 мл, 8 ммоль) для удаления одной из фенильных групп. Через 1 ч отфильтровывали образовавшийся осадок, к раствору добавляли 40 мл 0.5 М TEAB и монофениловый эфир димера (**XV**) экстрагировали дихлорметаном (50 мл × 2). Органическую фракцию упаривали досуха, остаток высушивали отгонкой с толуолом (25 мл × 2). Превращение полученного монофенилового эфира (**XV**) в соответствующий 4-метокси-1-оксидопиридин-2-метилfosфонат проводилось, как описано нами ранее для PNA-pPNA димеров [1, 13]. Выход соединения (**Ia**) 52 и соединения (**IIa**) 55%; R_f 0.10 (Б). (**Ia**): m/z 1009 ($M + H$)⁺: $C_{49}H_{52}N_8O_{14}P_1$; ^{31}P -ЯМР: 15.2 и 15.8. (**IIa**): m/z 983.5 ($M + H$)⁺: $C_{47}H_{51}N_8O_{14}P_1$; ^{31}P -ЯМР: 15.1 и 15.7.

Димеры (Iб) и (IIб). Метиловый эфир (**X**) или (**XII**) (2 ммоль) растворяли в ац. пиридине (4 мл) и прибавляли раствор тиминсодержащего pPNA-мономера (**IIIa**) (2.1 ммоль) в 12 мл ацетонитрила, а затем TPS-NT (3 ммоль). Через 5 мин реакцию терминировали прибавлением 5% NaHCO₃ (50 мл) и димер (**XVI**) экстрагировали CH₂Cl₂ (50 мл × 3). Объединенные органические фракции упаривали до масла, которое растворяли в 5% водном ацетонитриле (25 мл), содержащем DBU (5 ммоль). Через 2 ч прибавляли 0.5 М TEAB (50 мл). Целевой димер (**Iб**) или (**IIб**) выделяли экстракцией CH₂Cl₂ и очищали хроматографией на колонке с силикагелем в градиенте концентрации метанола (0–10%) в CH₂Cl₂, содержащем 1.5% триэтиламина. Выход 70–75%; R_f 0.2 (Б). (**Iб**): m/z (ES) 1009 ($M + H$)⁺: $C_{49}H_{53}N_8O_{14}P_1$; ^{31}P -ЯМР: 22.5 и 23.1. (**IIб**): m/z (ES) 984 ($M + H$)⁺: $C_{47}H_{51}N_8O_{14}P_1$; ^{31}P -ЯМР: 22.6 и 23.2.

Твердофазный автоматический синтез олигомеров проводился исходя из мономерных и димерных синтонов на синтезаторе фирмы Applied Biosystems (Модель 381A, США). В качестве носителя использовались стеклянные шарики CPG, функционализированные мономерами типа (**VIII**) или (**VII**), как это описано ранее [13, 16]. Условия проведения отдельных операций циклов наращивания цепи приведены в табл. 1. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов проводили как описано ранее [1]. Деблокирование pPNA- и PNA-олигомеров проводили как описано ранее [1, 13]. Удаление полиэфирных аналогов с носителя осуществляли действием смеси *трет*-бутиламин-диоксан (1 : 1) в течение 2 ч при 20°C. Очистку олигомеров выполняли FPLC или гель-электрофорезом. Ионообменную хроматографию проводили на FPLC-системе фирмы Pharmacia (Швеция) в линейном градиенте NaCl (0 → 1.2 М) за 20 мин в 0.02 М NaOH (рН 12) на колонке Mono-Q (Pharmacia) со скоростью подачи элюента 1 мл/мин. Обращенно-фазовую FPLC осуществляли на колонке PepRPC (Pharmacia) в линейном градиенте

концентрации ацетонитрила (10 → 30%) за 20 мин в 0.1 М триэтиламмонийacetате (рН 8). Электрофорез одноцепочечных олигомеров и образованных ими комплексов проводили как описано ранее [1, 13]. Структуры полученных таким образом миметиков приведены в табл. 2.

Кривые плавления комплексов олигомеров с комплементарными poly(dA) и poly(rA)-матрицами измерялись при 260 нм на спектрофотометре Gilford 250 UV VIS, оборудованном термоячейкой Gilford 2527. Использовались 3–5 мМ растворы олигомеров в буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl (рН 7.5) [или 10 мМ фосфат натрия (рН 5.5)], 5 мМ EDTA и 10 мМ MgCl₂. Перед началом измерений раствор выдерживали при 95°C в течение 2 мин, после чего охлаждали до 5°C. Скорость нагревания/охлаждения растворов составляла 0.5°C/мин.

Данная работа проводится при поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект № 98-04-48180).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ефимов В.А., Бурякова А.А., Чуб М.В., Чахмакчева О.Г. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 696–709.
2. De Mesmaeker A., Altmann K.-H., Waldner A., Wendeborn S. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1995. V. 5. P. 343–355.
3. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. // Science. 1991. V. 254. P. 1497–1500.
4. Nielsen P.E., Egholm M., Buchardt O. // Bioconjugate Chem. 1994. V. 5. P. 3–7.
5. Bergman F., Bannwarth W., Tam S. // Tetrahedron Lett. 1995. V. 36. P. 6823–6826.
6. Finn P.J., Gibson N.J., Fallon R., Hamilton A., Brown T. // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 3357–3364.
7. Uhlmann E., Will D.W., Breipohl G., Langner D., Rytz A. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1996. V. 35. P. 2632–2635.
8. Petersen K.H., Jensen D.K., Egholm M., Nielsen P.E., Buchardt O. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995. V. 5. P. 1119–1124.
9. Van der Laan A.C., Brill R., Kuimelis R.G., Kuyl-Yeheskiely E., van Boom J.H., Andrus A., Vinayak R. // Tetrahedron Lett. 1997. V. 38. P. 2249–2252.
10. Efimov V.A., Choob M.V., Kalinkina A.L., Chakhmakhcheva O.G., Stromberg R., van der Laan A.C., Meeuwenoord N., Kuyl-Yeheskiely E., van Boom J.H. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1996. V. 61. P. S262–S264.
11. Van der Laan A.C., Stromberg R., van Boom J.H., Kuyl-Yeheskiely E., Efimov V.A., Chakhmakhcheva O.G. // Tetrahedron Lett. 1996. V. 37. P. 7857–7860.
12. Peyman A., Uhlmann E., Wagner K., Augustin S., Breipohl G., Will D.W., Schafer A., Wallmeier H. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1996. V. 35. P. 2636–2638.
13. Efimov V.A., Choob M.V., Buryakova A.A., Kalinkina A.L., Chakhmakhcheva O.G. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 566–575.

14. Efimov V.A., Choob M.V., Buryakova A.A., Chakhmakhcheva O.G. // Nucleosides & Nucleotides. 1998. V. 17. P. 1671–1679.
15. Jordan S., Schwemler C., Kosch W., Kretschmer A., Stropp U., Schwenner E., Mielke B. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1997. V. 7. P. 687–690.
16. Efimov V., Buryakova A., Reverdatto S., Chakhmakhcheva O., Ovchinnikov Yu. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. P. 8369–8387.
17. Jordan S., Schwemler C., Kosch W., Kretschmer A., Schwenner E., Stropp U., Mielke B. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1997. V. 7. P. 681–686.

Peptide Nucleic Acids and Their Phosphonate Analogues. II. Synthesis and Physicochemical Properties of Hybrids Containing Serine and 4-Hydroxyproline Residues

V. A. Efimov[#], A. A. Buryakova, M. V. Choob, and O. G. Chakhmakhcheva

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

DNA mimics representing hybrids of peptide nucleic acids (PNA) or PNA phosphonate analogues (pPNA) with hydroxyamino acid derivatives, *L*-serine and *L*-4-*trans*-hydroxyproline, were synthesized. Preparative synthesis of monomers and some heterodimers derived from serine and hydroxyproline was developed. The corresponding mimic oligomers including pyrene-containing derivatives were prepared by the solid-phase automated synthesis. Ability of the resulting NA analogues to hybridize specifically to the DNA and RNA complementary strands was studied. It was shown that homothymine hybrids containing PNA or pPNA monomers alternating with hydroxyproline-derived monomers can form stable complexes with the complementary oligonucleotides, whose melting temperatures are close to those of equivalent PNA complexes.

Key words: complex formation, DNA mimics, hydroxyproline- and serine-based hybrids, oligonucleotides, peptide nucleic acids, phosphonate analogues

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: eva@ibch.siobc.ras.ru.