



УДК 547.963.32:577.113.4

СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТКИ ОЛЕИЛАМИНА

© 2001 г. С. Ю. Андреев, С. И. Анцыпович, Е. М. Волков,
Е. А. Романова, Т. Гианик*, Т. С. Орецкая#

Химический факультет и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119899, Москва, В-234, Воробьевы горы;

* Факультет биофизики и химической физики, Университет Коменского, Братислава, Словакия
Поступила в редакцию 13.11.2000 г. Принята к печати 18.01.2001 г.

Разработан метод направленного введения остатков олеиламина в составе 2'-дезокситидинового звена в любые заранее заданные положения олигодезоксирибонуклеотидов в процессе их автоматического синтеза. Показано, что наличие остатков олеиламина в 3'- или 5'-концевых нуклеотидах не влияет на термодинамическую стабильность ДНК-дуплексов, образованных такими олигонуклеотидами с комплементарной последовательностью. Обнаружено, что скорость гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда олигонуклеотидов, содержащих остатки олеиламина в 3'-концевых звеньях, существенно снижается по сравнению с природными олигонуклеотидами.

Ключевые слова: олигодезоксирибонуклеотиды модифицированные; твердофазный синтез; олеиламин.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы интенсивно развивается область химии нуклеиновых кислот, связанная с изучением их электрохимических свойств [1–5]. Это обусловлено возможностью использования электродов с иммобилизованными на них олигонуклеотидами для обнаружения нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов [1, 6–8]. Поэтому важной проблемой в увеличении степени технологичности аналитических и диагностических электрохимических процедур является разработка эффективных методов иммобилизации нуклеиновых кислот на поверхностях электродов.

Перспективным вариантом иммобилизации является нековалентное связывание [1–5] с участием остатков объемных гидрофобных молекул, таких, как липиды и жирные кислоты, введенных в нуклеотидные цепи, с гидрофобными электродными поверхностями (например, графитовой пастой или липидными мембранами). Для отработки методов иммобилизации фрагментов нуклеиновых кислот на поверхностях электродов требуются олигонуклеотиды, содержащие остатки гидрофобных молекул, которые, как правило, должны быть локализованы на концах олигонуклеотидной цепи. Иногда при этом одновременно модифицируют электрод, что позволяет в дальнейшем провести ковалентную иммобилизацию олигонуклеотидов. Так, с этой целью в работе [9] ис-

пользовали включение в графитовую пасту октадециламина и стеариновой кислоты.

Распространенным методом введения гидрофобных заместителей в олигонуклеотиды является соответствующая модификация отдельных звеньев в процессе синтеза олигомера. Описаны методы введения на 5'-конец олигонуклеотида остатков ундеканолола [10] и витамина Е [11] в процессе твердофазного синтеза, а также присоединения холестерина к 5'-концевой фосфатной группе защищенных олигонуклеотидов [12].

В работах, посвященных модификации 3'-концевых звеньев олигонуклеотидов в процессе твердофазного синтеза, как правило, применяют полимерный носитель СРГ (controlled pore glass), модифицированный бифункциональными реагентами, что позволяет после отщепления олигонуклеотида от полимера провести реакцию между 3'-модифицированным олигонуклеотидом и выбранной гидрофобной молекулой. Например, для введения в 3'-концевое звено остатка акридинилпропионовой кислоты в качестве бифункционального реагента использовали 6-аминогексанол-1 [13], а для введения остатков акридина и холестерина – N-замещенные этими остатками производные пиррола [14].

Известны также постсинтетические методы введения в олигонуклеотиды остатков больших гидрофобных молекул [15–17]. Остаток холестерина, содержащий спейсер с алифатической аминогруппой, присоединяли к олигонуклеотиду, активируя концевую фосфат [15]. Описано присоединение остатка холестерина к 3'-концевой фосфатной группе с использованием N-[(холестерилокси)карбо-

Автор для переписки (тел.: (095) 939-31-48; факс: (095) 939-31-81; e-mail: oretskaya@genebee.msu.su).

Молекулярные массы олигонуклеотидов (I)–(V), содержащих остатки олеиламина, по данным масс-спектрометрии, и температуры плавления дуплексов, образованных ими с комплементарным олигонуклеотидом (X)

Олиго- нуклеотиды	Первичная структура (5' → 3')	M_r (MALDI, m/z) (расч./эксп.)	Дуплекс с (X) [#]	Т.пл., °C (±1) ^{##}
(I)	CAC CTT GCT GAA ATT TTC CC*	6267.4/6266.0	A	41
(II)	CAC* CTT GCT GAA ATT TTC CC*	6531.9/6529.6	B	33
(III)	C*AC CTT GCT GAA ATT TTC CC*	6531.9/6526.7	C	38
(IV)	CAC* CTT GCT GAA ATT TTC CC	6267.4/6265.8	D	34
(V)	C*AC CTT GCT GAA ATT TTC CC	6267.4/6268.4	E	41
(VI)	AC* CTT GCT GAA ATT TTC CC*			
(VII)	AC CTT GCT GAA ATT TTC CC*			
(VIII)	AC* CTTG CT GAA ATT TTC C C*			
(IX)	CAC CTT GCT GAA ATT TTC CC		F (контроль)	41

C* – N⁴-олеил-5-метил-2'-дезокситидин.

[#] (3' → 5') GTG GAA CGA CTT TAA AAG GG (X).

^{##} Термодинамическую устойчивость дуплексов определяли в фосфатном буфере при концентрации дуплекса 3.3 мкМ в диапазоне температур 5–50°C.

нил]этилендиамина [16] или 5'-концевому фосфату – через дисульфидную группировку [17].

Предложенные методы не являются универсальными и не могут быть использованы для одновременной модификации 3'- и 5'-концевых фрагментов, а также для введения внутрицепочечных модифицированных звеньев.

В настоящей работе предложен метод введения в олигонуклеотиды остатков гидрофобных молекул, который заключается во включении модифицированного звена в любое заданное положение олигонуклеотидной цепи в процессе автоматического амидофосфоритного синтеза без изменений стандартного регламента. Концы олигонуклеотида, таким образом, остаются свободными. Это расширяет область применения таких производных, поскольку остается возможность звеления в олигонуклеотид радиоактивных или иных меток, а также включения модифицированных по внутрицепочечным звеньям олигонуклеотидов в более протяженные фрагменты нуклеиновых кислот. В качестве гидрофобного заместителя использовали остаток олеиламина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения олигонуклеотидов, содержащих остатки олеиламина, применили метод, связанный с использованием реакционноспособного производного тимидина, несущего в С4-положении остаток триазола. Модификацию 5'-O-защитенного тимидина (1) проводили на основе стандартной методики (схема 1) [18]. 1-(5'-O-Диметокситритил-2'-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-4-(1-триазол-ил)-5-метил-2-пиримидон (2a) вводили в реакцию с олеиламином с образованием 5'-O-диметокситритил-N⁴-олеил-5-метил-2'-дезокситидина (2b). С целью получения мономерного синтона (3b) для олигонуклеотидного синтеза соединение (2b) обрабатывали N,N-диизопропиламидо-β-дианэтилхлорфосфоритом (схема 2).

Амидофосфоритное производное (3b) вводили в автоматический олигонуклеотидный синтез, увеличивая стандартное время конденсации до 4 мин, а концентрацию (3b) – до 0.12 М. Степень превращения на стадии присоединения (3b) составляла не менее 95%.

С целью получения олигонуклеотидов, содержащих модифицированное звено на 3'-конце, нук-

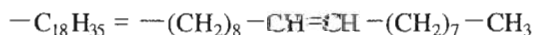
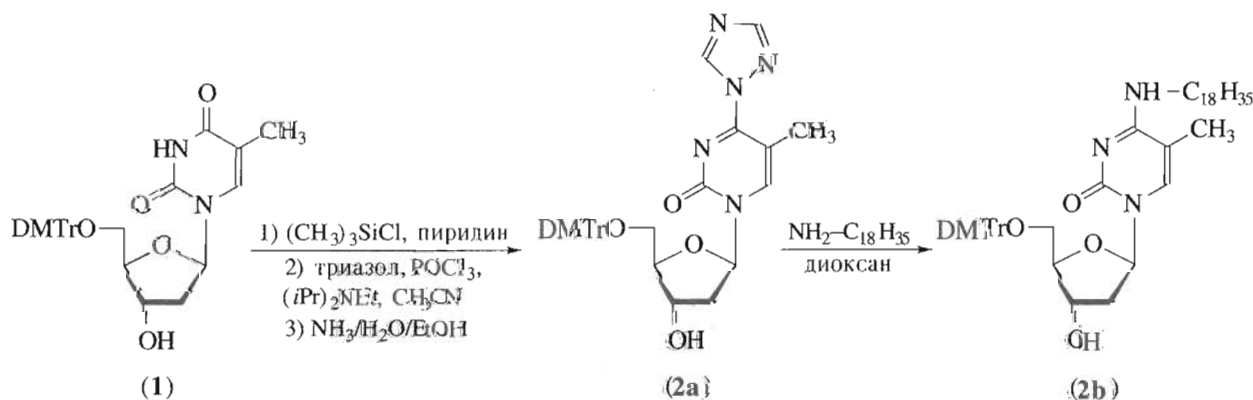


Схема 1.

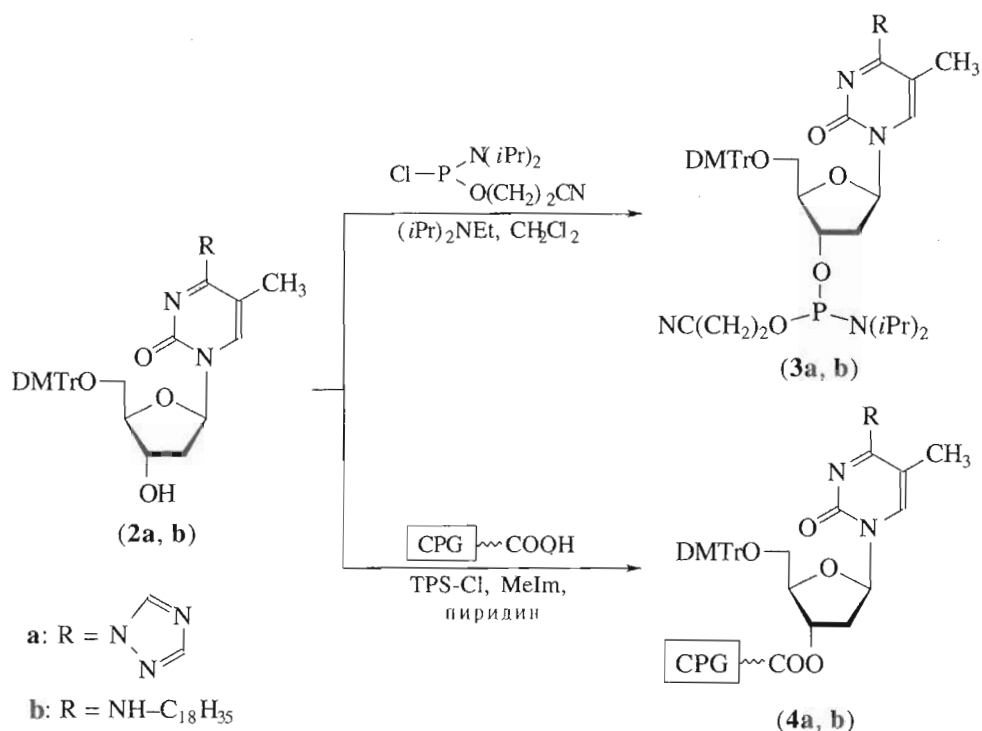


Схема 2.

леозид (**2b**), в соответствии со схемой 2, иммобилизовали на полимерном носителе CPG-500, получая носитель (**4b**).

С использованием в конкретных случаях соединения (**3b**) и/или полимерного носителя (**4b**) были синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды (**I**)–(**VIII**), содержащие остатки олеиламина в цитидиновых звеньях (см. таблицу).

Молекулярные массы модифицированных олигонуклеотидов (**I**)–(**V**) определены масс-спектрометрически (см. таблицу).

Последовательности целевых олигонуклеотидов комплементарны фрагментам ДНК патогенной бактерии *Salmonella*. Олигомеры выделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, используя гидрофобные свойства остатка олеиламина. ВЭЖХ показала, что время удерживания олигонуклеотидов изменялось в полном соответствии с природой и количеством введенных функциональных групп (рис. 1).

Для оценки эффективности предложенного подхода был опробован альтернативный метод синтеза олигонуклеотидов, содержащих остатки олеиламина. С использованием амидофосфитного производного (**3a**) и полимерного носителя (**4a**) (схема 2) были синтезированы олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие 1-(2'-деокси-β-D-рибофуранозил)-4-(1-триазолил)-5-метил-2-пиримидон. Остатки триазола замещали на олеиламин после окончания синтеза олигонуклеотидов до удаления защитных групп и отщепления олигомера с полимерного носителя.

Отметим, что выходы на стадии обработки активированных олигонуклеотидов-предшественни-

ков олеиламином (по данным аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ) отличались от количественных. Во всех случаях ВЭЖХ показала присутствие в реакционных смесях дополнительных пиков. Предположительно они соответствуют олигонуклеотидам, содержащим в местах модификации 5-метил-2'-дезокситидин. Таким образом, первый из предложенных методов синтеза оказался более эффективным.

Было проведено исследование термодинамической устойчивости дуплексов, образуемых модифицированными олигонуклеотидами (**I**)–(**V**), а также немодифицированным олигонуклеотидом (**IX**) с комплементарным 20-звенным олигонуклеотидом (**X**) (таблица).

Оказалось, что температуры плавления дуплексов, образованных олигонуклеотидами, несущими гидрофобные заместители в 3'- или 5'-концевых звеньях (дуплексы **A** и **E**, соответственно), не отличаются от температуры плавления природного дуплекса **F**. В связи с этим следует ожидать, что олигонуклеотиды, содержащие модификации на концах цепи, при иммобилизации на гидрофобной электродной поверхности будут эффективно гибридизоваться с комплементарными последовательностями ДНК из раствора.

С другой стороны, температура плавления дуплекса, содержащего модификации на обоих концах цепи (дуплекс **C**), оказалась немного ниже (различие составляет 3°C). Наличие модифицированного звена внутри цепи (дуплексы **B** и **D**) несколько снижает термодинамическую устойчивость. Так, температура плавления дуплекса **D** на

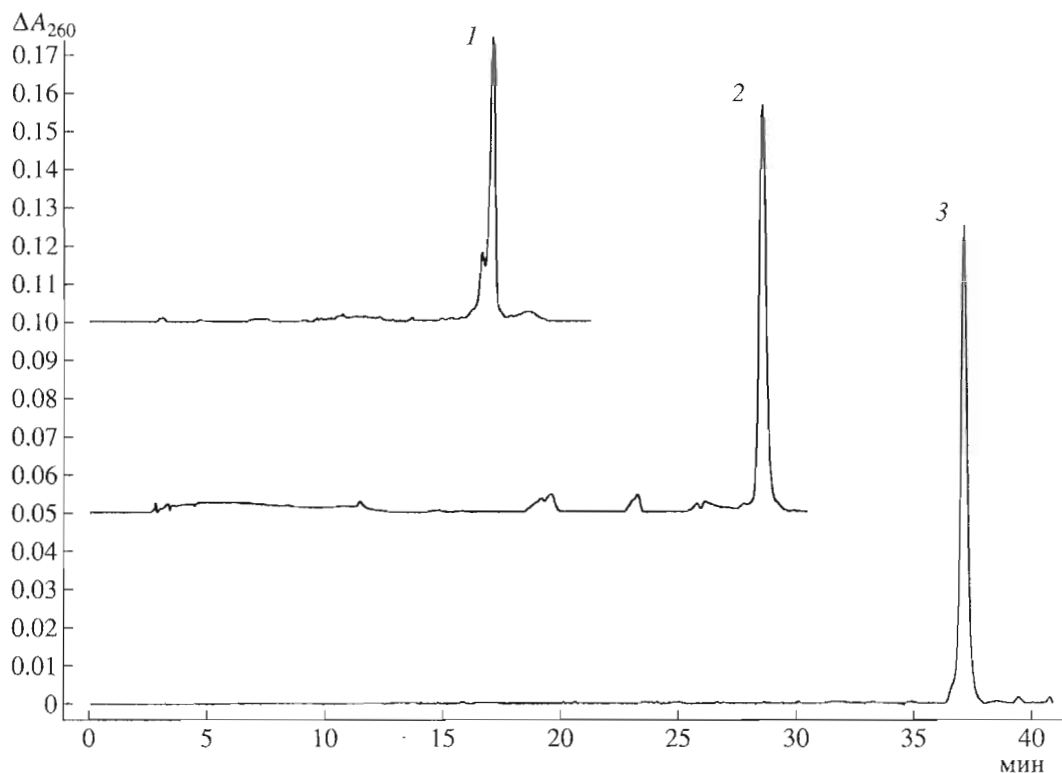


Рис. 1. ВЭЖХ олигонуклеотида (IX) (1); олигонуклеотида (I), содержащего один остаток олеиламина (2); олигонуклеотида (III), содержащего два остатка олеиламина (3) (условия см. "Эксперимент. часть").

7°C, а дуплекса **B**, содержащего модификации как внутри, так и на конце цепи на 8°C ниже температуры плавления природного дуплекса **F**.

Была изучена кинетика ферментативного гидролиза немодифицированного олигонуклеотида (IX) (рис. 2а) и олигонуклеотида (III), содержащего гидрофобные остатки на обоих концах (рис. 2б). Устойчивость олигонуклеотидов к действию фосфодиэстеразы змеиного яда исследовали в условиях гидролиза до нуклеозидов с последующим анализом гидролизата методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте. В качестве внутреннего стандарта для минимизации погрешности эксперимента при анализе реакционных смесей использовали уридин.

Как видно из рис. 2а, гидролиз немодифицированного олигонуклеотида (IX) фосфодиэстеразой змеиного яда приводит к появлению многочисленных промежуточных продуктов различной длины, которые подвергаются дальнейшему гидролизу. В случае модифицированного олигонуклеотида (III), содержащего остатки олеиламина, не наблюдается накопления продуктов частичного расщепления, так как они гидролизуются быстрее, чем сам исходный модифицированный олигонуклеотид. Это наглядно иллюстрируется рис. 2б, на котором реакционная смесь представлена двумя основными пиками – исходного олигонуклеотида и внутреннего стандарта.

Полученные данные позволяют сравнить скорости гидролиза модифицированного (III) и немодифицированного (IX) олигонуклеотидов. В концентрационном диапазоне, далеком от субстратного насыщения ($C_s = 1.2 \times 10^{-5}$ М), убывь концентрации олигонуклеотидов в процессе ферментативного гидролиза удовлетворительно описывается экспоненциальной зависимостью от времени. Начальные скорости гидролиза олигонуклеотидов (IX) и (III), рассчитанные по тангенсу угла наклона прямых, равны соответственно $(1.45 \pm 0.18) \times 10^{-7}$ и $(2.6 \pm 0.02) \times 10^{-8}$ М с⁻¹. Отношение начальных скоростей составляет 5.6 ± 0.6 , т.е. наличие остатка олеиламина в составе 3'-концевого звена олигонуклеотида вызывает существенное замедление ферментативного гидролиза олигонуклеотида по сравнению с немодифицированным аналогом. Это свойственно для большинства 3'-модифицированных олигонуклеотидов и является очевидным преимуществом для гибридного анализа ДНК в природных объектах.

Таким образом, нами разработана эффективная схема введения модифицированных остатками олеиламина звеньев цитидина в заданное положение олигонуклеотидной цепи в процессе автоматического олигонуклеотидного синтеза. Высокие выходы продуктов конденсации при включении модифицированных звеньев позволяют использовать предложенные методы для синтеза олигонуклеотидов, содержащих два гидрофобных заместителя.

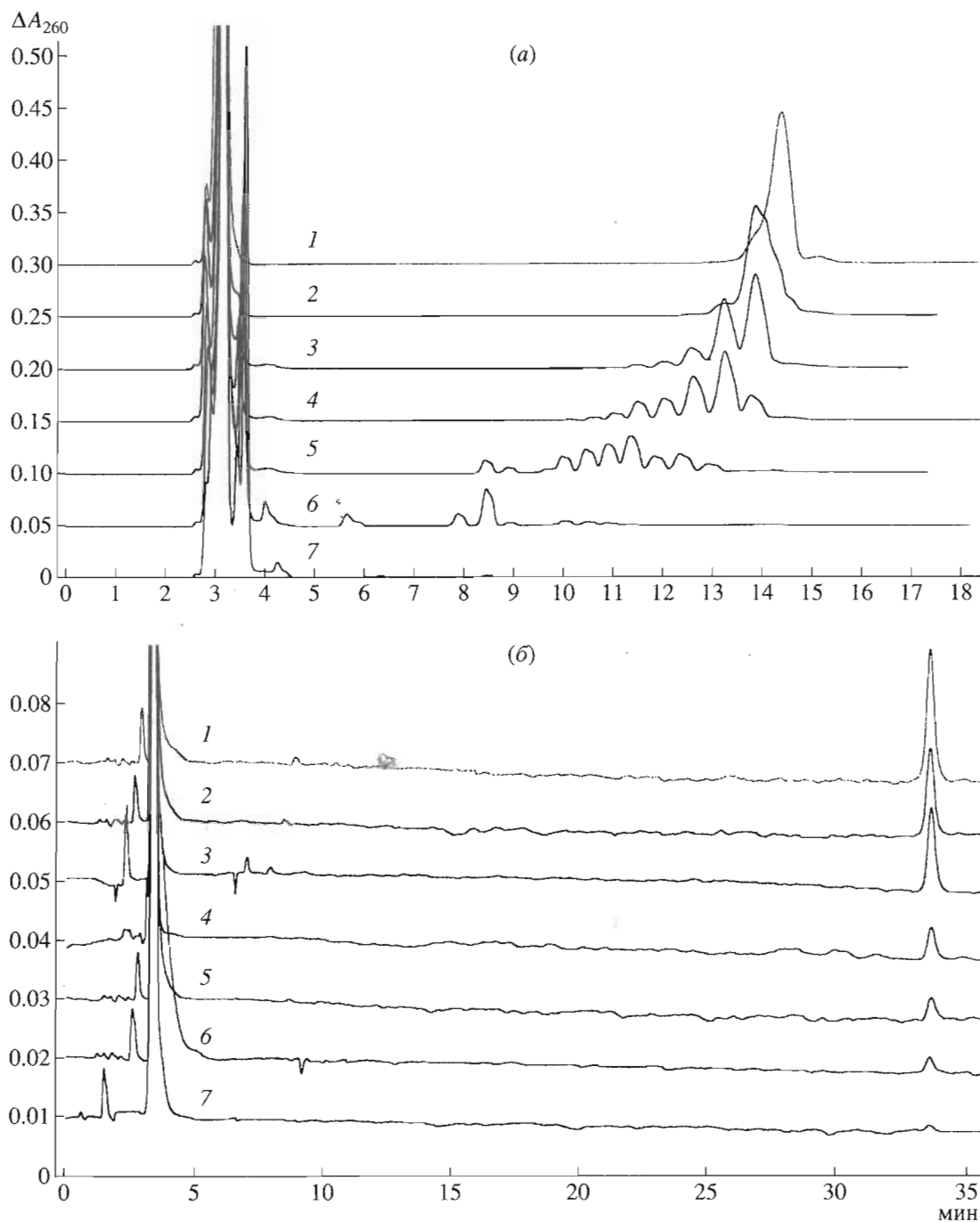


Рис. 2. ВЭЖХ продуктов гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда немодифицированного олигонуклеотида (IX) (а); модифицированного олигонуклеотида (III) (б); время гидролиза: 0 (1); 1 (2); 3 (3); 5 (4); 10 (5); 20 (6); 30 мин (7) (условия см. "Эксперимент. часть").

В ближайшее время планируется исследовать закономерности иммобилизации на поверхностях электродов олигонуклеотидов, содержащих остатки олеиламина, и их электрохимического поведения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы 5'-*O*-диметокситри-тил-3'-(*N,N*-диизопропиламино)-β-цианэтилфос-

фиты 2'-дезоксирибонуклеозидов (Glen Research, Великобритания), тимидин (Sigma, США), 5'-*O*-диметокситритилтимидин, диметокситритилхлорид, олеиламин, янтарный ангидрид, 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид (Aldrich, США), *N*-мети-лимидазол, *N,N*-диизопропиламино-β-цианэтил-хлорфосфит, 4-(*N,N*-диметил)аминопиридин, триметилхлорсилан и триэтиламин (Fluka, Швейцария),

триазол, тетразол (Pharmacia, Швеция), *N,N*-диизо-пропилэтиламин (Merck, ФРГ), хлорокись фосфора (V), трифторуксусная кислота (Россия), абсолютные растворители ацетонитрил, пиридин, триэтиламин, хлороформ, хлористый метилен, этанол.

Тонкослойную хроматографию осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) с использованием следующих систем растворителей: А – хлороформ–этанол, 95 : 5; Б – хлороформ–этанол, 9 : 1; В – хлористый метилен–триэтиламин, 98 : 2. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в системах растворителей: Г – градиент концентрации этанола в хлороформе (от 0 до 5%); Д – то же (от 0 до 15%).

Оптическое поглощение и УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. Кривые температурной зависимости УФ-поглощения при 260 нм регистрировали на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония), снабженном термостатированным кюветодержателем и блоком для измерения температуры, при непрерывном повышении температуры со скоростью 0.5°C/мин.

Масс-спектры записывали на масс-спектрометре Finnigan MAT VISION 2000 TOF (MALDI).

5'-*O*-Диметокситритил-3'-*O*-триметилсилитимидин получали аналогично методике [19] и без выделения использовали для получения соединения (2а).

1-(5'-*O*-Диметокситритил-2'-дезоксид-β-*D*-рибозифуранозил)-4-(1-триазолил)-5-метил-2-пиримидон (2а). 6.4 г (93 ммоль) триазола суспендировали в 50 мл ацетонитрила и добавляли 1.96 мл (16.9 ммоль) хлорокиси фосфора (V). Далее по каплям при перемешивании и охлаждении льдом добавляли 15 мл (110 ммоль) триэтиламина и выдерживали 30 мин при 20°C, после чего добавляли раствор 5'-*O*-диметокситритил-3'-*O*-триметилсилитимидина (5 ммоль) в 20 мл ацетонитрила. Реакцию вели в течение 15 мин при 20°C. По окончании реакции (ТСХ в системе Б) реакционную смесь промывали водой, органическую фазу концентрировали в вакууме до пенообразного остатка и хроматографировали на колонке с силикагелем в системе растворителей Д. Выход (2а) 1.42 г (48%); *R*_f 0.75 (А).

5'-*O*-Диметокситритил-*N*⁴-олеил-5-метил-2'-дезокситидин (2б). 0.3 г (0.5 ммоль) соединения (2а) растворяли в 5 мл диоксана и добавляли 1.5 мл (4.6 ммоль) олеиламина. Полноту прохождения реакции (20°C) контролировали ТСХ (система Б). По окончании реакции (1 ч) реакционную смесь упаривали до масла и хроматографировали на колонке с силикагелем в системе растворителей Г. Выход (2б) 0.36 г (90%); *R*_f 0.67 (Б).

3'-(*N,N*-Диизопропиламидо)-β-цианэтилфосфит 1-(5'-*O*-диметокситритил-2'-дезоксид-β-*D*-рибозифуранозил)-4-(1-триазолил)-5-метил-2-пиримидона (3а) и 5'-*O*-диметокситритил-*N*⁴-олеил-3'-(*N,N*-диизопропиламидо)-β-цианэтилфосфит 5-метил-

2'-дезокситидина (3б) получали из соединений (2а) и (2б) на основе методики [20].

Иммобилизацию 1-(5'-*O*-диметокситритил-2'-дезоксид-β-*D*-рибозифуранозил)-4-(1-триазолил)-5-метил-2-пиримидона (2а) и 5'-*O*-диметокситритил-*N*⁴-олеил-5-метил-2'-дезокситидина (2б) на полимерном носителе проводили на основе методики [21]. Аминопропил-СРG (200 мг) с загрузкой аминогруппами 0.05 ммоль/г суспендировали в 500 мкл пиридина, добавляли 100 мг (0.86 ммоль) янтарного ангидрида и 5 мг (0.04 ммоль) 4-(*N,N*-диметиламино)пиридина. Реакцию проводили в течение 4 ч при 20°C, периодически встряхивая реакционную смесь. Полимер отмывали на стеклянном фильтре пиридином (3 × 5 мл), этанолом (3 × 5 мл) и диэтиловым эфиром (3 × 5 мл) и высушивали в вакууме масляного насоса. К модифицированному янтарным ангидридом носителю добавляли 500 мкл пиридина и 100 мкл триметилхлорсилана. После добавления реагентов полимер дегазировали, реакцию вели в течение 8 ч при 20°C. Носитель промывали на стеклянном фильтре пиридином (3 × 5 мл), этанолом (3 × 5 мл) и диэтиловым эфиром (3 × 5 мл) и высушивали в вакууме масляного насоса. Полученный полимерный носитель суспендировали в 500 мкл пиридина, добавляли 30 мг (0.1 ммоль) триизопропилбензолсульфохлаорида и 23 мкл (0.3 ммоль) *N*-метилимидазола, выдерживали 15 мин и добавляли 25 мг (0.04 ммоль) соединения (2а) (или 28 мг (0.035 ммоль) соединения (2б)). Реакцию вели в течение 2 ч при 26°C, после чего носитель обрабатывали метанолом и оставляли на ночь, далее промывали пиридином (3 × 5 мл), этанолом (3 × 5 мл) и диэтиловым эфиром (3 × 5 мл). Загрузку полимерного носителя нуклеозидом определяли по количеству диметокситритильных групп, которое измеряли спектрофотометрически в растворе, содержащем продукты обработки точной навески полимерного носителя трифторуксусной кислотой. После высушивания получили по 200 мг полимеров (4а) и (4б) с загрузкой нуклеозидом порядка 0.025 ммоль/г.

Синтез олигонуклеотидов, содержащих модифицированные звенья, проводили на автоматическом ДНК-синтезаторе Applied Biosystems 380В (США) по амидофосфитной методике, используя растворы модифицированных амидофосфитов в концентрации 0.12 М, увеличив время их конденсации до 4 мин. Для замещения остатка триазола на олеиламин в случае использования амидофосфитного производного (3а) и полимерного носителя (4а) олигонуклеотиды до удаления защитных групп и отщепления с полимерного носителя обрабатывали 1 М раствором олеиламина в диоксане в течение 30 мин. Полимер промывали диоксаном (3 × 5 мл) и дистиллированной водой (3 × 5 мл).

Деблокирование олигонуклеотидов после синтеза проводили как описано в работе [20].

Исследование кинетики ферментативного гидролиза олигонуклеотидов (III) и (IX) фосфодиэстеразой змеиного яда. 0.2 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида

и 1.0 ОЕ₂₆₀ уридина растворяли в 16 мкл 0.2 М Трис-НСI-буфера (рН 8.5), содержащего 0.04 М хлорид магния, и добавляли 4 мкл фосфодиэстеразы змеиного яда (1.0×10^4 ед. акт./мл). Реакционную смесь инкубировали при 37°C. Через определенные промежутки времени отбирали пробы объемом по 4 мкл, реакцию в которых терминировали охлаждением в жидком азоте.

Анализ реакционных смесей олигонуклеотидов проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте на хроматографе фирмы "Waters" (США) (колонка Диасорб С-16Т (Россия), подвижная фаза: логарифмический градиент 5–40% ацетонитрила, буфер: 48 мМ фосфат калия, рН 7.0, 2 мМ фосфат тетрабутиламмония).

Выделение олигонуклеотидов, содержащих гидрофобные заместители, проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе фирмы "Gilson" (колонка Beckman Ultrasphere Octyl (США) (4.6 × 25 мм), подвижная фаза: линейный градиент 0–80% ацетонитрила за 80 мин в 20 мМ ацетате аммония).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.Н. Ташлицкому за помощь в проведении ВЭЖХ модифицированных олигонуклеотидов.

Работа выполнена при поддержке гранта INCO-Copernicus IC15-CT98-0915 и гранта РФФИ № 00-04-48260.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Millan K.M., Mikkelsen S.R. // *Anal. Chem.* 1993. V. 65. P. 2317–2323.
2. Krznaric D., Cosovic B. // *Anal. Biochem.* 1986. V. 156. P. 454–462.
3. De Lumley-Woodyear T., Campbell C.N., Heller A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. P. 5504–5505.
4. Souteyrand E., Cloarec J.P., Martin J.R., Wilson C., Lawrence I., Mikkelsen S., Lawrence M.F. // *J. Phys. Chem. B.* 1997. V. 101. P. 2980–2985.
5. Palecek E., Fojta M., Tomchik M., Wang J. // *Biosens. Bioelectron.* 1998. V. 13(6). P. 621–628.
6. Wang J., Cai X., Shiraishi H., Farias P.A., Dontha N. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68(15). P. 2629–2634.
7. Wang J., Gustavo R., Fernandes J.R., Paz J.L.L., Jiang M., Waymire R. // *Anal. Chim. Acta.* 1998. V. 375. P. 197–203.
8. Korri-Youssoufi H., Garnier F., Srivastava P., Godillot P. // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. V. 119. P. 7388–7389.
9. Millan K.M., Saraullo A., Mikkelsen S.R. // *Anal. Chem.* 1994. V. 66(18). P. 2943–2948.
10. Kabanov A.V., Vinogradov S.V., Ovcharenko A.V., Krivonos A.V., Melik-Nubarov N.S., Kiselev V.I., Severin E.S. // *FEBS Lett.* 1990. V. 259. P. 327–330.
11. Will D.W., Brown T. // *Tetrahedron Lett.* 1992. V. 33. P. 2729–2732.
12. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Часовских М.Н. // *Биоорганическая химия.* 1990. Т. 16. С. 610–616.
13. Petrie C.R., Reed M.W., Adams A.D., Meyer R.B., Jr. // *Bioconj. Chem.* 1992. V. 3. P. 85–87.
14. Gamper H.B., Reed M.W., Cox T., Viroso J.S., Adams A.D., Gall A.A., Schroller J.K., Meyer R.B., Jr. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 145–150.
15. Zarytova V.F., Ivanova E.M., Levina A.S. // *Nucleosides Nucleotides.* 1991. V. 1. P. 1.
16. Letsinger R.L., Zhang G., Sun D.K., Ikeuchi T., Sarin P.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 6553–6556.
17. Boutorine A.S., Le Doan T., Battioni J.P., Mansuy D., Dupre D., Helene C. // *Bioconj. Chem.* 1990. V. 1. P. 350–356.
18. Sang W.L. // *J. Org. Chem.* 1982. V. 47. P. 3623–3628.
19. Ogilvie K.K., Iwacha D.J. // *Tetrahedron Lett.* 1973. V. 14. P. 317–319.
20. Sproat B.S. // *Protocols for Oligonucleotides and Analogs* / Ed. S. Agrawal. Totowa: Humana Press Inc., 1993. P. 115–143.
21. Pon R.T. // *Protocols for Oligonucleotides and Analogs* / Ed. S. Agrawal. Totowa: Humana Press Inc., 1993. P. 437–465.

Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides Containing Oleylamine Moieties

S. Yu. Andreev*, S. I. Antsyovich*, E. M. Volkov*,
E. A. Romanova*, T. Hianik**, and T. S. Oretskaya*

e-mail: oretskaya@genebee.msu.su.

*Department of Chemistry and Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

**Department of Biophysics and Chemical Physics, Comenius University,
Mlynska dolina F1, 84248 Bratislava, Slovak Republic

A method for directional introduction of oleylamine residues to any position of oligodeoxyribonucleotides during their automated synthesis was developed. The presence of oleylamine residues in 3'- or 5'-terminal nucleotides was shown to have no effect on the thermodynamic stability of DNA duplexes formed by such oligonucleotides and the complementary sequences. The rate of the snake venom phosphodiesterase hydrolysis of oligonucleotides containing oleylamine residues in the 3'-terminal units was shown to be markedly lower than that of natural oligonucleotides. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: modified oligodeoxyribonucleotides; solid phase synthesis; oleylamine