



УДК 547.32.577.113.4

## КОНЪЮГАТЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ 5'-КОНЦЕВУЮ КАРБОКСИЛЬНУЮ ГРУППУ, С РАЗЛИЧНЫМИ НУКЛЕОФИЛЬНЫМИ АГЕНТАМИ: ТВЕРДОФАЗНЫЙ СИНТЕЗ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ

© 2003 г. А. В. Качалова\*, В. Н. Ташлицкий\*, Д. А. Стеценко\*\*,  
Е. А. Романова\*, М. Дж. Гейт\*\*, Т. С. Орецкая\*#

\*Химический факультет и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского  
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,  
119992, Москва, Воробьевы горы;

\*\* Лаборатория молекулярной биологии, Медицинский исследовательский центр,  
Кембридж, Великобритания

Поступила в редакцию 06.03.2002 г. Принята к печати 07.06.2002 г.

С использованием твердофазного химического синтеза получены конъюгаты олигонуклеотидов, содержащих 5'-концевую карбоксильную группу, с различными аминами и короткими пептидами. Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте установлена корреляционная зависимость времен удерживания синтезированных соединений от их физико-химических параметров.

*Ключевые слова:* ВЭЖХ, обращенно-фазовая в ион-парном варианте, модифицированные олиго-дезоксирибонуклеотиды, олигонуклеотидопептиды.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для изучения закономерностей белково-нуклеинового узнавания, а также для решения ряда задач молекулярной биологии активно используются конъюгаты олигонуклеотидов с различными молекулами. К фрагментам нуклеиновых кислот ковалентно присоединяют репортерные молекулы, интеркаляторы, биологически активные пептиды и ферменты [1–3]. К настоящему моменту методы химического синтеза производных олигонуклеотидов, содержащих нуклеофильные группы (амино- [4] и меркапто- [5]), а также конъюгатов на их основе [6], хорошо разработаны. Напротив, число методов получения конъюгатов олигонуклеотидов на основе производных с карбоксильной или альдегидной функцией ограничено. Методы синтеза таких производных олигонуклеотидов, предложенные в работах [7, 8], предполагают введение карбоксильной группы по 3'-концу олигонуклеотида за счет модификации полимерного носителя дополнительным звеном ненуклеотидной природы. Авторы работы [7] осуществляли последующие взаимодействия с пептидами и флуоресцентными метками в водном растворе по-

сле отщепления олигонуклеотида от полимерного носителя. В работе [8] предложен метод получения конъюгатов *in situ*: олигонуклеотид отщепляли от полимерного носителя с помощью соответствующего нуклеофильного агента.

Введение карбоксильной группы по 5'-концу олигонуклеотида предполагает либо присоединение модифицированного звена в процессе автоматического синтеза [9], либо образование функциональной группировки по окончании наращивания олигонуклеотидной цепи после полного деблокирования олигонуклеотида [10]. Дальнейшее взаимодействие с нуклеофильным компонентом осуществлялось в растворе, что может сопровождаться низкими выходами, продолжительным временем реакции и возможным образованием ряда побочных продуктов. В этой связи для получения производных олигонуклеотидов более удобным может оказаться твердофазный метод синтеза из-за простоты проведения реакции и удаления избытков реагентов. Так, авторы работы [11, 12] вводили по 5'-концу олигонуклеотидной цепи модифицированное звено, содержащее активированный эфир карбоновой кислоты. После этого к модифицированным олигонуклеотидам до отщепления от полимерного носителя ковалентно присоединяли нуклеофильные компоненты. К недостаткам предложенного метода можно отнести длительное время конъюгации (6–12 ч) [11], не-

Сокращения: НОВТ – *N*-гидроксисбензотриазол; НВТУ – гексафторфосфат *O*-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-*N,N,N,N*'-тетраметилурия.

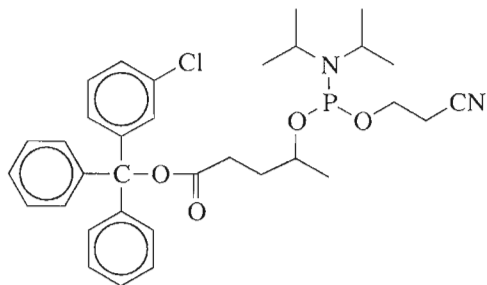
# Автор для переписки (тел.: (095) 939-31-48; факс: (095) 939-31-81; эл. почта: oretskaya@belozersky.msu.ru).

стабильность использованных модифицированных амидофосфитов при хранении и образование побочных продуктов при конъюгации [12].

Цель настоящей работы – твердофазный химический синтез конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих 5'-концевую карбоксильную группу, с различными аминами и короткими пептидами (табл. 1). Также интересным представлялось получение корреляционной зависимости времени удерживания полученных соединений при анализе методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (офВЭЖХ) в ион-парном варианте от их физико-химических параметров, что могло бы позволить быстро и надежно оценить эффективность конденсации модифицированного олигонуклеотида с соответствующим нуклеофильным компонентом и провести косвенное подтверждение строения полученного соединения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модификацию олигонуклеотидной цепи по 5'-концу мы осуществляли с использованием *O*-[1-метил-3-(2-хлортритилоксикарбонил)пропил]-*O'*-2-цианэтил-*N,N*-диизопропиламидофосфита, синтез которого описан нами в работе [13].



Реагент содержит *o*-хлортритиловую сложноэфирную группу [14], которая может быть селективно расщеплена действием разбавленной трихлоруксусной кислоты. Это позволяет деблокировать карбоксильную группу в ходе автоматического твердофазного синтеза, не затрагивая других защитных групп олигонуклеотида, и осуществлять дальнейшие превращения на твердой фазе в органической среде.

Амидофосфит вводился в автоматический олигонуклеотидный синтез на его последней стадии без изменений стандартного регламента конденсации. Карбоксильную функцию деблокировали в режиме стандартного детритилирования. Для получения конъюгатов и последующего изучения хроматографических свойств была синтезирована олигодезоксирибонуклеотидная последовательность:



Олигонуклеотид (I) содержит в своем составе фрагмент (подчеркнут в формуле), компонен-

тарный участку TAR РНК Tat-белка вируса иммунодефицита человека. Анализ реакционной смеси синтеза олигонуклеотида (I) методом офВЭЖХ выявил наличие двух пиков, соответствующих двум разным соединениям. Их образование может быть объяснено наличием асимметрического атома углерода в структуре 5'-концевого линкера. После их разделения методом офВЭЖХ было показано, что оба соединения обладают одинаковым временем удерживания в условиях ион-парной офВЭЖХ. Строение полученного олигонуклеотида (I) доказано также данными масс-спектрометрии (табл. 2).

Для подтверждения наличия 5'-концевой карбоксильной группы и проверки ее реакционной способности проводили реакцию отщепленного от полимера и деблокированного олигонуклеотида (I) с дигидрохлоридом этилендиамина при активации водорастворимым карбодиимидом. Выход продукта реакции составил 98%.

Защищенный олигонуклеотид (I) со свободной карбоксильной функцией вводили в реакцию с нуклеофильными компонентами на твердой фазе в органической среде. Для подбора условий конденсации, анализа и выделения конъюгатов в качестве моделей были выбраны алифатический (1) и два ароматических (2) и (3) амина (табл. 1). Выходы соответствующих конъюгатов **A1**, **A2**, **A3** составили 98–100%. При проведении реакции предварительно активировали модифицированный олигонуклеотид (I) смесью НВТУ–НОВТ (1 : 1) в течение 35 мин при 35°C в абсолютном диметилформамиде. После добавления соответствующего амина смесь инкубировали еще 1 ч.

Аналогичным образом были синтезированы конъюгаты с аминокислотами и короткими пептидами (табл. 1). Выходы полученных соединений близки к количественным (90–100%), за исключением конъюгата **P3** (выход 80%). Последнее может объясняться более низкой реакционной способностью вторичной аминогруппы пролина. После конденсации конъюгаты деблокировали и отщепляли от носителя в стандартных условиях [15]. Реакционные смеси анализировали с помощью офВЭЖХ в ион-парном варианте (рисунок). Результаты анализа в ряде случаев показали образование двух продуктов. Последние, по нашему мнению, являются диастереомерами конъюгатов, что было подтверждено данными масс-спектрометрии после разделения изомеров методом офВЭЖХ (табл. 2).

Для контроля чистоты и определения эффективности конденсации был использован ион-парный метод офВЭЖХ с эквидистантным градиентом. Разработанный в нашей лаборатории метод эквидистантного разделения олигонуклеотидов [16] заключается в том, что увеличение длины олигонуклеотида на одно звено приводит к увеличению времени удерживания на постоянную и различную для каж-

Таблица 1. Структуры и выходы синтезированных конъюгатов

Нуклеофильный компонент синтеза	Структура конъюгата	Обозначение конъюгата	Степень превращения при конъюгации*, %
2-(2-Гидроксиэтокси)этиламин (1)		A1	100
Тетрагидрофуруриламин (2)		A2	100
2-Фенилэтиламин (3)		A3	100
H-Leu-NH <sub>2</sub> (4)		A4	98
H-Phe-NH <sub>2</sub> (5)		A5	98
H-Gly-Phe-NH <sub>2</sub> (6)		P1	90
H-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub> (7)		P2	90
H-Pro-Leu-Gly-NH <sub>2</sub> (8)		P3	80

R = <sup>5'</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-O-олигонуклеотид-OH<sup>3'</sup>.

\* Рассчитана по данным ВЭЖХ.

**Таблица 2.** Молекулярные массы исходного олигонуклеотида и полученных конъюгатов

Соединение	$M_R$ расщ.	$M_R$ эксп.
<b>(I)</b>	4702.06	4700.89
<b>A1</b>	4789.2	4787.1
<b>A2*</b>	4785.3	4783.1/4784.2
<b>A3*</b>	4805.02	4801.6/4803.2
<b>A4*</b>	4814.2	4812.2/4811.68
<b>A5*</b>	4848.2	4847.8/4848.7
<b>P1</b>	4905.3	4904.71
<b>P2</b>	5003.5	5006.5
<b>P3</b>	4969.4	4973.0

\* Молекулярные массы, данные через косую черту, соответствуют двум разделенным диастереомерам.

дого из мононуклеотидов величину, не зависящую от длины олигонуклеотида. Вклад нуклеотидного звена является аддитивным и обусловлен двумя составляющими: ион-парным взаимодействием межнуклеотидного фосфата с катионом тетрабутиламмония с последующей сорбцией на поверхности неполярной неподвижной фазы и непосредственным гидрофобным взаимодействием гетероциклического основания с поверхностью неполярной неподвижной фазы. Первая составляющая постоянна для всех нуклеотидов, а вторая обуславливает различие парциального вклада конкретного нуклеотидного звена. В этом случае время удерживания олигонуклеотида определяется суммой парциальных вкладов нуклеотидов, входящих в его состав.

В данной работе продемонстрировано использование преимуществ ион-парного метода офВЭЖХ для анализа модифицированных олигонуклеотидов, различающихся структурой присоединенного к олигонуклеотиду радикала. Мы предлагаем связать изменение времени удерживания олигонуклеотида с физико-химическими параметрами присоединенных к нему соединений: гидрофобностью, кислотно-основными свойствами, молекулярной массой и молекулярным объемом. Для расчета констант кислотности и гидрофобности радикалов с учетом их возможной ионизации, а также построения корреляционных уравнений со статистическим анализом экспериментальных данных был использован пакет программ, любезно предоставленный компанией "ACDLabs".

Структуры присоединенных радикалов, использованных для построения корреляционного уравнения, были отобраны таким образом, чтобы в программе, предсказывающей их хроматографическую подвижность, они имели существенно различающиеся времена удерживания и соответственно различные значения  $\lg D$  – коэффициента распределения вещества между органической и водной фазами с учетом возможной ионизации (в зависимости от pH). Олигонуклеотид **(I)** и конъюгаты **A1**, **A2**, **A3**, **A5**

были проанализированы в стандартных условиях ион-парного разделения протяженных олигонуклеотидов с шагом 0.5 мин/звено. Соединения **A2**, **A3**, **A5** обнаружили два пика предполагаемых диастереомеров с одинаковой молекулярной массой (табл. 2). Пики изомерных продуктов **A3**, **A5** имели достаточное разрешение в условиях офВЭЖХ. Изомеры разделяли, и индивидуальные диастереомеры анализировали методом офВЭЖХ в ион-парном варианте. Хроматографические данные были экспортированы в ACD/Chromman 4.5, обработаны, и структуры присоединенных к олигонуклеотиду радикалов отнесены к соответствующим пикам. Найденные времена удерживания и структуры радикалов были перенесены в ACD/LC Simulator 5.09.

Был проведен расчет корреляционного уравнения на основании времен удерживания пиков, соответствующих конъюгатам **A1**, **A2-1**, **A3-1**, **A5-1** и олигонуклеотиду **(I)** (где **A2-1**, **A3-1**, **A5-1** – первые из двух пиков изомеров) по модели обращенно-фазового разделения:

$$\lg(t_R - t_0) = 0.049(\pm 8.2e - 3) \lg D + 2.90(\pm 4.5e - 3), \quad (A)$$

$n = 5$ ,  $R = 0.9608$ ,  $StD = 0.026$ , где  $n$  – число образцов,  $t_R$  – время удерживания;  $\lg D$  – коэффициент распределения вещества между органической и водной фазами с учетом возможной ионизации (в зависимости от pH), рассчитанный программой для каждого из соединений,  $R$  – коэффициент корреляции;  $StD$  – стандартное отклонение.

Расчет уравнения (A) велся с учетом следующих дополнительных параметров: обращенная фаза; pH = 7.00;  $t_0 = 2.50$  мин.

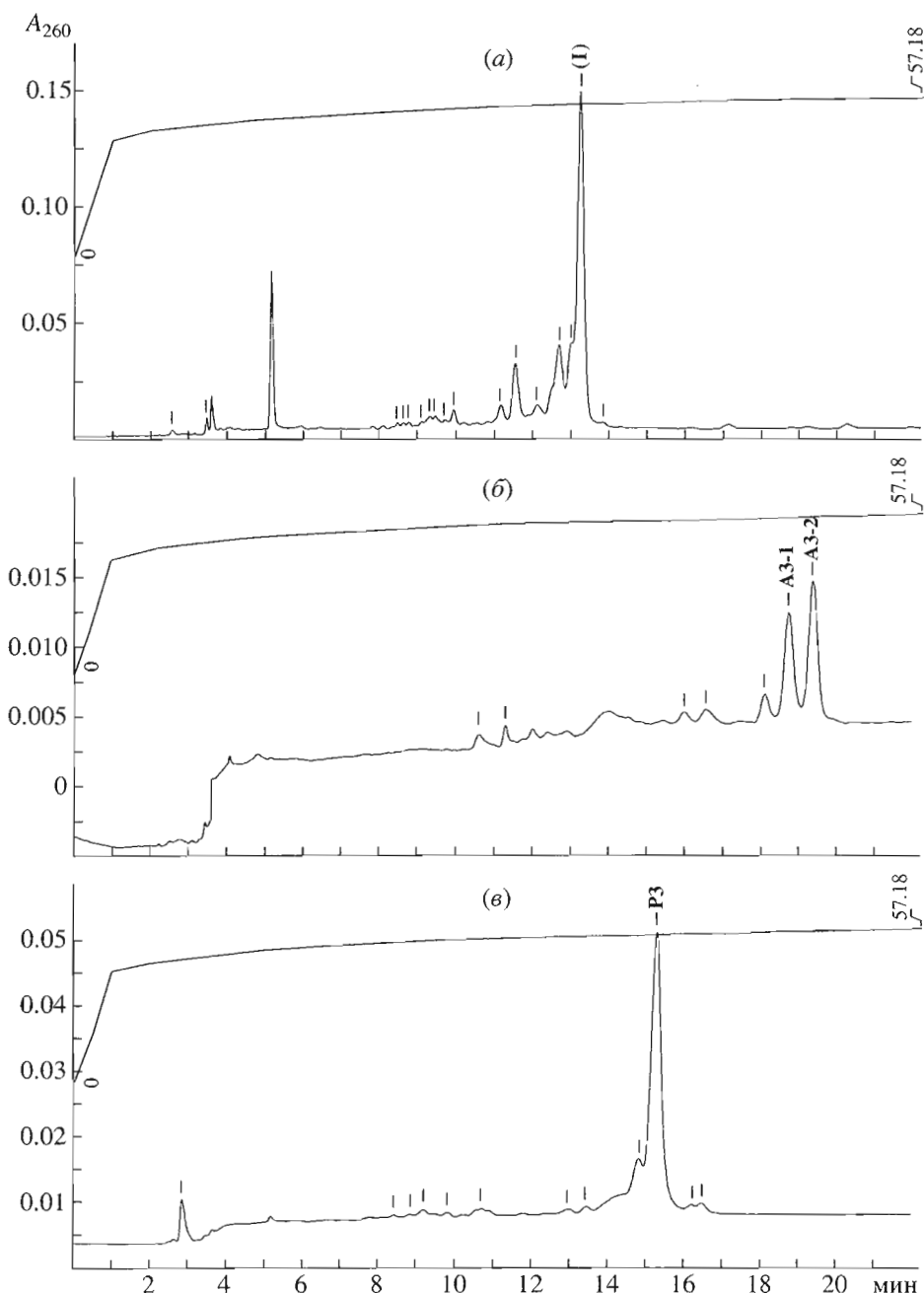
Также проводили аналогичный расчет на основании времен удерживания пиков, соответствующих конъюгатам **A1**, **A2-2**, **A3-2**, **A5-2** и олигонуклеотиду **(I)** (где **A2-2**, **A3-2**, **A5-2** – вторые из двух пиков изомеров):

$$\lg(t_R - t_0) = 0.054(\pm 7.5e - 3) \lg D + 2.91(\pm 4.1e - 3), \quad (B)$$

$n = 5$ ,  $R = 0.9724$ ,  $StD = 0.024$ .

Расчет уравнения (B) велся с учетом следующих дополнительных параметров: обращенная фаза; pH = 7.00;  $t_0 = 2.50$  мин.

Несмотря на хорошие коэффициенты корреляции, использование только  $\lg D$  в качестве корреляционного параметра приводит к систематической погрешности предсказания времени удерживания олигонуклеотида **(I)** – 12.4 и 12.5 мин по уравнениям A, B, соответственно, вместо 13.07 мин и как следствие к нарушению предсказанной последовательности выхода пиков конъюгата **A1** и олигонуклеотида **(I)**. Занижение предсказанных значений времени удерживания модифицированного олигонуклеотида обусловлено



Анализ методом офВЭЖХ в ион-парном варианте реакционных смесей: автоматического синтеза олигонуклеотида (I) (a), синтеза конъюгата А3 (б) и конъюгата P3 (в).  
Условия проведения ВЭЖХ указаны в “Эксперимент. части”.

частичной диссоциацией карбоксильной группы при рН 7. Ионизированная карбоксильная группа способна к ион-парному взаимодействию с ионом тетрабутиламмония. Это приводит к наблюдаемому экспериментально увеличению времени удерживания олигонуклеотида. Учет этого фактора возможен при использовании смешанного режима анионного обмена и обращенно-фазового взаимодействия при расчете корреляционных уравнений. Вклад анионного обмена в механизме удерживания определяется эмпирическим параметром “ус-

ловный заряд” (Z). Оказалось, что коэффициент корреляции достигает максимума и предсказанная последовательность выхода пиков конъюгата А1 и олигонуклеотида (I) соответствует экспериментальной при Z = 4. Исходя из этого, новые корреляционные уравнения имеют вид (C), (D).

Был проведен расчет корреляционного уравнения (C) на основании времен удерживания пиков продуктов А1, А2-1, А3-1, А5-1 и (I) по модели анионного обмена:

**Таблица 3.** Хроматографическая подвижность полученных соединений

Соединение	$t_R$		
	эксп.	вычисл. по серии 1*	вычисл. по серии 2**
(I)	13.07	13.17	13.23
A1	12.79	12.78	12.95
A2-1	13.84	13.53	–
A2-2	14.61	–	13.9
A3-1	18.74	18.22	–
A3-2	19.37	–	18.9
A4-1	14.65	14.75	–
A4-2	15.13	–	15.28
A5-1	15.39	15.98	–
A5-2	16.05	–	16.78
P1	17.43	15.85	16.28
P2	19.26	17.77	19.32
P3	15.52	15.96	17.11

\* Серия 1 – базовая смесь составлена из конъюгатов **A1**, **A2-1**, **A3-1**, **A5-1** и олигонуклеотида **(I)**, расчет по уравнению (C).

\*\* Серия 2 – базовая смесь составлена из конъюгатов **A1**, **A2-2**, **A3-2**, **A5-2** и олигонуклеотида **(I)**, расчет по уравнению (D).

$$\lg(t_R - t_0) = 0.052(\pm 0.011)\lg D' + 7.6e - 4(\pm 2.9e - 4)MV + 2.77(\pm 0.015), \quad (C)$$

$n = 5$ ,  $R = 0.9725$ ,  $StD = 0.027$ , где  $\lg D'$  – коэффициент распределения вещества между органической и водной фазами с учетом электростатического взаимодействия заряженной органической среды с заряженными частицами, находящимися в водном растворе,  $MV$  – молекулярный объем.

Расчет уравнения (C) велся с учетом следующих дополнительных параметров: анионный обмен;  $pH = 7.00$ ,  $Z = 4.00$ ;  $t_0 = 2.50$  мин.

По найденному уравнению предсказанные времена удерживания **A4-1**, **P1**, **P2** и **P3** соответствуют экспериментальным (табл. 3).

Также был проведен аналогичный расчет на основании времен удерживания конъюгатов **A1**, **A2-2**, **A3-2**, **A5-2** и **(I)**

$$\lg(t_R - t_0) = 0.053(\pm 0.012)\lg D' + 9.3e - 4(\pm 3.2e - 4)MV + 2.76(\pm 0.017), \quad (D)$$

$n = 5$ ,  $R = 0.9705$ ,  $StD = 0.030$ .

Расчет уравнения (D) велся с учетом следующих дополнительных параметров: анионный обмен;  $pH = 7.00$ ;  $Z = 4.00$ ;  $t_0 = 2.50$  мин.

Как видно из полученных результатов (табл. 3), предсказанные времена удерживания двух изомеров, полученных при присоединении остатка аминокислоты (**4**), находятся в хорошем соответствии с наблюдаемыми экспериментально. Повышенные погрешности определения времен удержива-

ния конъюгатов с остатками дипептида **P1**, трипептидов **P2** и **P3** обусловлены, по-видимому, более сложной структурой и возможными в связи с этим внутримолекулярными взаимодействиями.

Таким образом, твердофазным методом были получены конъюгаты олигонуклеотидов, содержащих 5'-концевую карбоксильную функцию, с различными аминами по методикам, описанным нами в [13]. Предложенный подход может быть рекомендован и для получения олигонуклеотидопептидов, хотя в ряде случаев ограничен растворимостью протяженных пептидов в полярных апротонных растворителях (диметилформамид, диметилсульфоксид). Исползованный метод ион-парной офВЭЖХ с эквидистантным градиентом в сочетании со специально разработанным пакетом программ ACDLabs позволяет проводить быстрое подтверждение строения модифицированного соединения.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы 5'-*O*-диметокситритил-3'-(*N,N*-диизопропиламино)- $\beta$ -цианэтилфосфиты 2'-дезоксирибонуклеозидов, 5-*S*-этилтиотетразол, полимерный носитель dN CPG-500 с загрузкой первым нуклеозидным звеном 35–40 мкмоль/г (Glen Research, США); триэтиламин, гексафторфосфат *O*-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-*N,N,N,N*-тетраметилуриния (HBTU), *N*-гидроксибензотриазол (HOBT), диметилформамид (Fluka, Швейцария), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, 2-(2-гидроксиэтокси)этиламин, дигидрохлорид этилендиамина, перхлорат лития (Sigma, США), гидрохлориды амидов аминокислот и пептидов (Vachem, Великобритания), тетрагидрофурурил-амин, 2-фенилэтиламин (Реахим, Россия).

MALDI-TOF-масс-спектры регистрировали на приборе Voyager DE фирмы PerSeptive Biosystems (США).

Автоматический синтез модифицированного олигодезоксирибонуклеотида **(I)** осуществляли амидофосфитным методом на синтезаторе Applied Biosystems 380B (США) с применением коммерческих реагентов и растворителей по стандартному регламенту. Использовали раствор модифицированного амидофосфита в абсолютном ацетонитриле с концентрацией 0.18 М.

Анализ реакционных смесей и контроль чистоты продуктов после выделения проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте на хроматографе Waters (США) с шагом элюции два нуклеотидных звена в минуту. Использовали колонку 4 × 250 мм Диасорб-130-С16<sub>T</sub> (размер частиц 7 мкм). Условия аналитического разделения: температура колонки – 45°C, расход элюента – 1 мл/мин. Элюент – 48 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.0), содержащий 2 мМ дигидрофосфат тетрабутиламмония; градиент концентрации ацетонитрила 5–20.4% (1 мин); 20.4–21.6% (1 мин); 21.6–23.2% (3 мин); 23.2–24.4% (5 мин); 24.4–25.6% (10 мин).



Выделение синтезированных конъюгатов и разделение смесей соответствующих диастереомеров проводили методом офВЭЖХ на хроматографе Трасог (Голландия). Использовали колонку 4 × 250 мм с сорбентом Диасорб-130-С16<sub>T</sub> (размер частиц 7 мкм). Условия разделения: температура колонки – 45°C, расход элюента – 1 мл/мин. Элюент – 0.1 М ацетат аммония; градиент концентрации ацетонитрила 0–40% (80 мин).

**Реакция модифицированного олигонуклеотида (I) с дигидрохлоридом этилендиамина.** К раствору 0.4 ОЕ<sub>260</sub> олигонуклеотида (I) в 40 мкл воды добавляли 5.3 мг дигидрохлорида этилендиамина и 3 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида. Инкубировали 3 ч при комнатной температуре. Олигонуклеотиды осаждали, прибавляя к реакционной смеси 100 мкл 2 М раствора перхлората лития и 1 мл ацетона, переосаждали и промывали 300 мкл ацетона. Анализ полученных продуктов проводили с использованием офВЭЖХ в ион-парном варианте в условиях, описанных выше.

**Синтез конъюгатов.** После завершения автоматического синтеза и деблокирования карбоксильной группы к модифицированному олигонуклеотиду (I), иммобилизованному на полимерном носителе, добавляли раствор смеси НВТУ (100 экв.) и НОВТ (100 экв.) в 150 мкл абсолютного диметилформамида и инкубировали при 35°C 35 мин, периодически встряхивая. Затем добавляли амин (100 экв.) и, в случае соединений (4)–(8), триэтиламин (100 экв.). Смесь выдерживали 1 ч при 35°C при перемешивании, центрифугировали, супернатант удаляли, полимер промывали последовательно диметилформамидом (2 × 200 мкл), этанолом (2 × 200 мкл) и водой (2 × 100 мкл). Отщепление конъюгатов от полимерного носителя и деблокирование функциональных групп проводили в условиях, описанных в работе [15]. Реакционные смеси анализировали методом офВЭЖХ в ион-парном варианте, выделение конъюгатов осуществляли методом офВЭЖХ в условиях, описанных выше. Строение полученных соединений подтверждали методом масс-спектрометрии.

Работа выполнена при поддержке гранта Wellcome Trust (№ 057361) и программы “Ведущие научные школы” (№ 00-15-97944). Авторы благодарят А.Н. Муравьеву (химический факультет МГУ) за помощь при хроматографическом выделении полученных соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beaucage S.L., Iyer R.P.* // *Tetrahedron*. 1993. V. 49. P. 10441–10488.
2. *Стеценко Д.А., Арзуманов А.А., Коршун В.А., Гейт М.Дж.* // *Молекуляр. биология*. 2000. Т. 34. С. 998–1006.
3. *Tung C.-H., Stein S.* // *Bioconj. Chem*. 2000. V. 11. P. 605–618.
4. *Agrawal S.* // *Protocols for Oligonucleotide Conjugates* / Ed. S. Agrawal. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 1994. P. 93–120.
5. *Fidanza J.A., Ozaki H., McLaughlin L.W.* // *Protocols for Oligonucleotide Conjugates* / Ed. S. Agrawal. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 1994. P. 121–144.
6. *Зубин Е.М., Романова Е.А., Орецкая Т.С.* // *Успехи химии*. 2002. Т. 71. С. 273–302.
7. *Kahl J.D., Greenberg M.M.* // *J. Org. Chem*. 1999. V. 64. P. 507–510.
8. *Hovinen J., Guzaev A., Azhayev A., Lonnberg H.* // *Tetrahedron*. 1994. V. 50. P. 7203–7218.
9. *Kremsky J.N., Wooters J.L., Dougherty J.P., Meyers R.E., Collins M., Brown E.L.* // *Nucl. Acids Res*. 1987. V. 15. P. 2891–2909.
10. *Gottikh M., Asseline U., Thuong N.T.* // *Tetrahedron Lett*. 1990. V. 31. P. 6657–6660.
11. *Hovinen J., Guzaev A., Azhayev A., Lonnberg H.* // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 1994. V. 19. P. 2745–2750.
12. *Guzaev A., Manoharan M.* // *Bioorg. and Med. Chem. Lett*. 1998. V. 8. P. 3671–3676.
13. *Kachalova A.V., Stetsenko D.A., Romanova E.A., Tashlitsky V.N., Gait M.J., Oretskaya T.S.* // *Helv. Chim. Acta*. 2002. V. 85. P. 2409–2416.
14. *Athanassopoulos P., Barlos K., Gatos D., Hatzi O., Tsavara C.* // *Tetrahedron Lett*. 1995. V. 36. P. 5645–5648.
15. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* / Ed. F. Eckstein. Oxford. New York, Tokyo: IRL Press, 1991.
16. *Ташлицкий В.Н., Орецкая Т.С.* // *Биоорган. химия*. 1997. Т. 23. С. 732–741.

**Solid Phase Synthesis and Chromatographic Characteristics of Nucleophilic Agents Conjugated with Oligonucleotides Containing 5'-Terminal Carboxyl Group**

**A. V. Kachalova\*, V. N. Tashlitsky\*, D. A. Stetsenko\*\*, E. A. Romanova\*, M. J. Gait\*\*, and T. S. Oretskaya\*\***

# Phone: +7 (095) 939-3148, fax: +7 (095) 939-3181, e-mail: oretskaya@belozersky.msu.ru

\* Faculty of Chemistry and Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Lomonosov State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

\*\* Laboratory of Molecular Biology, Medical Research Council, Hills Road, Cambridge, CB2 2QH, United Kingdom

Conjugates of amines or short peptides with oligonucleotides containing 5'-terminal carboxyl group were prepared by solid phase chemical synthesis. A correlation between the physicochemical parameters and retention times of the synthesized conjugates was established by ion-pair reversed-phase HPLC. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: ion-pair reversed-phase HPLC, modified oligodeoxyribonucleotides, oligonucleotidepeptides