



УДК 547.963.3:577.113.6.088.53:543.422.25

## ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ ФАКТОРОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ДУПЛЕКСОВ, ОБРАЗУЕМЫХ КОНЬЮГАТАМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С МАЛОБОРОЗДОЧНЫМИ ЛИГАНДАМИ

© 2005 г. В. А. Рябинин<sup>\*,#</sup>, А. С. Буторин<sup>\*\*</sup>, К. Элен<sup>\*\*</sup>,  
А. Ю. Денисов<sup>\*\*\*</sup>, Д. В. Пышный<sup>\*\*\*</sup>, А. Н. Сняков<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт молекулярной биологии, ГНЦ ВБ “Вектор”,  
630559, Кольцово, Новосибирская обл.;

<sup>\*\*</sup>Национальный музей естественной истории, Париж, Франция;

<sup>\*\*\*</sup>Новосибирский институт химической биологии и фундаментальной  
медицины СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию 16.08.2004 г. Принята к печати 03.09.2004 г.

Методом термической денатурации изучено влияние структурных факторов на стабильность дуплексов, образованных олигонуклеотидами, конъюгированными с лигандами малой бороздки ДНК в виде моно- или дифосфамидов общей формулы  $\text{Oligo-MGB}_m$  (где  $\text{Oligo}$  – олигонуклеотид,  $m = 1$  или  $2$ ;  $\text{MGB} = -\text{L}(\text{Py})_2\text{R}$ ,  $-\text{L}(\text{Py})_4\text{R}$ ,  $-\text{L}(\text{Im})_4\text{R}$ ,  $-\text{L}(\text{Py})_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}(\text{Py})_4\text{R}$ ,  $\text{Py}$  остаток 4-амино-1-метилпиррол-2-карбоновой кислоты,  $\text{L}$  – остаток  $\gamma$ -аминомасляной или  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты,  $\text{R} = -\text{OEt}$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NEt}_2$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{N}^+\text{Me}_3$ ). Способ укладки лигандов в малую бороздку олигонуклеотидного дуплекса зависит от структуры конъюгата – параллельная по типу “голова-голова” для бисфосфамидов и антипараллельная по типу “голова-хвост” для монофосфамидов, образованных лигандом шпильчатой структуры. Влияние на  $T_{\text{пл}}$  дуплекса конъюгированных лигандов, находящихся в параллельной ориентации (бисфосфамид,  $\text{MGB} = -\text{L}(\text{Py})_4\text{R}$ ,  $m = 2$ ), близко к таковому для лигандов шпильчатой структуры с антипараллельной ориентацией (монофосфамид,  $\text{MGB} = -\text{L}(\text{Py})_4(\text{CH}_2)_3\text{CO}(\text{Py})_4\text{R}$ ,  $m = 1$ ). Влияние структуры линкера ( $\text{L}$ ) и заместителя ( $\text{R}$ ) на величину  $T_{\text{пл}}$  проявляется в большей степени для монофосфамида ( $\text{MGB} = -\text{L}(\text{Py})_n\text{R}$ ,  $m = 1$ ), чем для бисфосфамида ( $\text{MGB} = -\text{L}(\text{Py})_n\text{R}$ ,  $m = 2$ ). В малую бороздку дуплекса возможно встраивание не более двух олигопирролкарбоксамидных остатков (в параллельной или антипараллельной ориентации). Более того, на примере монофосфамидов ( $\text{Oligo-L}(\text{Py})_4\text{R}$  и  $\text{Oligo-L}(\text{Py})_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}(\text{Py})_4\text{R}$ ) показано, что присоединение второго лиганда, способного встраиваться в малую бороздку, приводит к повышению  $T_{\text{пл}}$  соответствующего дуплекса относительно дуплекса, образуемого исходным монофосфамидом, тогда как введение лиганда, не способного к встраиванию, понижает величину  $T_{\text{пл}}$ . Характер взаимодействия конъюгированного лиганда с олигонуклеотидным дуплексом определяется его структурой. Так, дипирролкарбоксамид, содержащий на  $\text{C}$ -конце лиганда этоксигруппу, стабилизирует дуплекс за счет стэкинг-взаимодействия с концевой  $\text{A}\cdot\text{T}$ -парой, тогда как тетрапирролкарбоксамиды стабилизируют дуплекс путем встраивания в малую бороздку.

*Ключевые слова:* лиганды малой бороздки ДНК; олигонуклеотид; конъюгат; дистамицин; сиквенспецифичные полиамиды.

### ВВЕДЕНИЕ

Дизайн, синтез и использование малобороздочных лигандов, т.е. лигандов, связывающихся с ДНК в малой бороздке сайт-специфичным обра-

зом, является бурно развивающимся направлением последнего десятилетия. Природными предшественниками этого класса соединений являются нетропсин и дистамицин, содержащие в своей структуре ди- и трипирролкарбоксамидные фрагменты, связывающиеся с АТ-трактом В-формы ДНК. Интенсивные исследования аналогов этих соединений позволили сформулировать основные принципы дизайна малобороздочных лигандов, способных связываться с ДНК сиквенспецифичным образом (см., например, [1, 2]). В основе этого подхода лежит обнаруженный в результате структурных исследований факт укладки в малую бороздку ДНК двух лигандов в антипараллельной

Сокращения:  $\text{MGB}$  – малобороздочный лиганд;  $\text{Py}$  и  $\text{Im}$  – остатки 1-метил-4-аминопиррол-2-карбоновой и 1-метил-4-аминоимидазол-2-карбоновой кислот соответственно;  $\text{L}$  (линкер) – остаток  $\gamma$ -аминомасляной или  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты;  $\text{R} = -\text{OEt}$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{NEt}_2$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{N}^+\text{Me}_3$ ;  $\Delta T$  – разница температур плавления модифицированного и немодифицированного дуплексов.

<sup>#</sup>Автор для переписки (тел.: (3832) 30-46-53; эл. почта: ryabinin@niboch.nsc.ru).

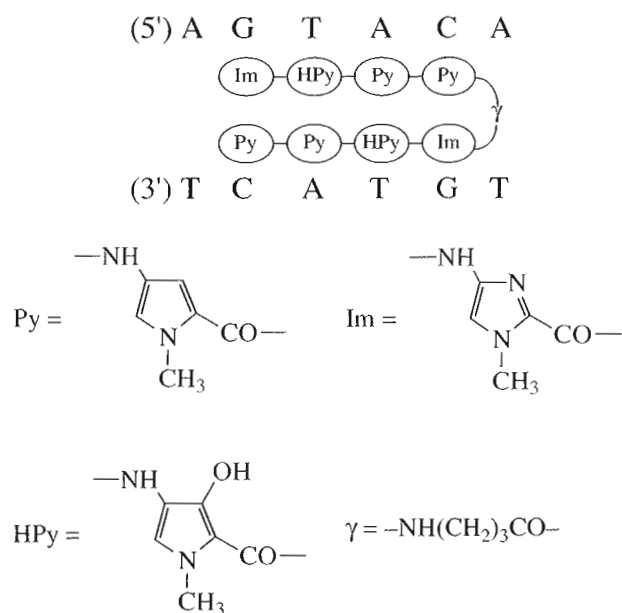


Схема 1.

ориентации [3]. Позднее Дерваном были предложены и синтезированы смешанные олиго(метилимидазол/метилпиррол)карбоксамиды, дающие шпильчатые структуры, соединенные между собой линкером по типу “голова-хвост” (схема 1). Он же предложил своеобразный “универсальный код”, по которому Im/Py-паре соответствует G•C-пара, Py/Im-паре – C•G-пара, а Py/Py-паре – как A•T-, так и T•A-пара. Вырожденность взаимодействия Py/Py-пар удалось снять, вводя в положение 3 пиррольного кольца гидроксигруппу – паре Py/HPy при этом отвечает A•T-пара, HPy/Py – T•A-пара [4–6]. Такого рода структуры оказались способными к высокоспецифичному связыванию с определенной нуклеотидной последовательностью, что было продемонстрировано в основном на примере нуклеотидных дуплексов, состоящих из четырех пар оснований. Была показана также возможность использования остатка  $\beta$ -аланина вместо пирролкарбоксамидного остатка [7] при дискриминации C•G- и G•C-пар и пирразольного

остатка вместо 3-гидрокси-пиррольного остатка для различия A•T- и T•A-пар [8].

Большой интерес представляют конъюгаты малобороздочных лигандов с олигонуклеотидами. Такого рода конъюгаты обладают повышенной сайт-специфичностью, которая обеспечивается как олигонуклеотидной, так и лигандной частью конъюгата [9–14]. Успешным оказалось использование конъюгатов MGB с олигонуклеотидами-праймерами, позволившее повысить как прочность, так и специфичность связывания праймера с ДНК-мишенью [15]. В ряде других работ конъюгаты олигонуклеотидов с малобороздочными лигандами использовали для стабилизации триплексов [16–19]. Перспективным оказался подход, в котором к 3'- или 5'-концевой фосфатной группе олигонуклеотида присоединяются два остатка MGB, образуя структуру с двумя лигандами в параллельной ориентации, которые стабилизируют олигонуклеотидный дуплекс, аналогично шпильчатым структурам [19–21]. Это дает основание полагать, что возможно конструирование сайт-специфичных лигандов с параллельно ориентированными олиго(метилпиррол/метилимидазол)карбоксамидными остатками.

В рамках этого направления исследований в настоящей работе нами рассмотрено влияние структурных факторов, таких, как размер олигокарбоксамиды, длина линкера и природа заместителя на С-конце олигокарбоксамиды на стабильность дуплексов, образуемых олигонуклеотидами, содержащими один или два малобороздочных лиганда, присоединенных к фосфатной группе олигонуклеотида своей N-концевой частью.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее употребимая методика при получении конъюгатов олигонуклеотидов с MGB предложена авторами работы [22] и состоит в присоединении реагента, содержащего первичную аминоалкильную группу к олигонуклеотиду по фосфатной группе с образованием монофосфамида в присутствии трифенилфосфина, дипиридилдисульфида и диметиламинопиридина. Позднее в работе [20] было показано, что к фосфатной группе возможно

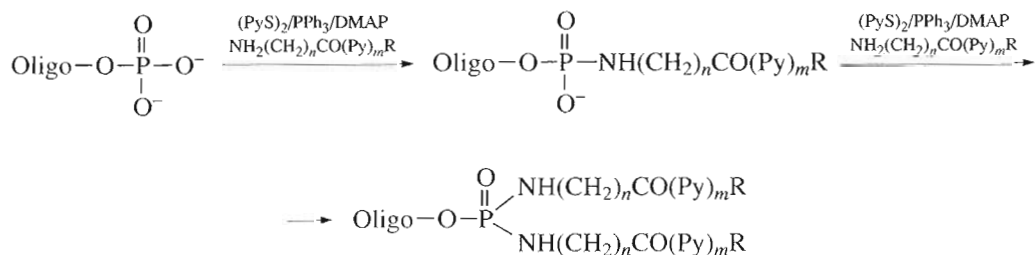
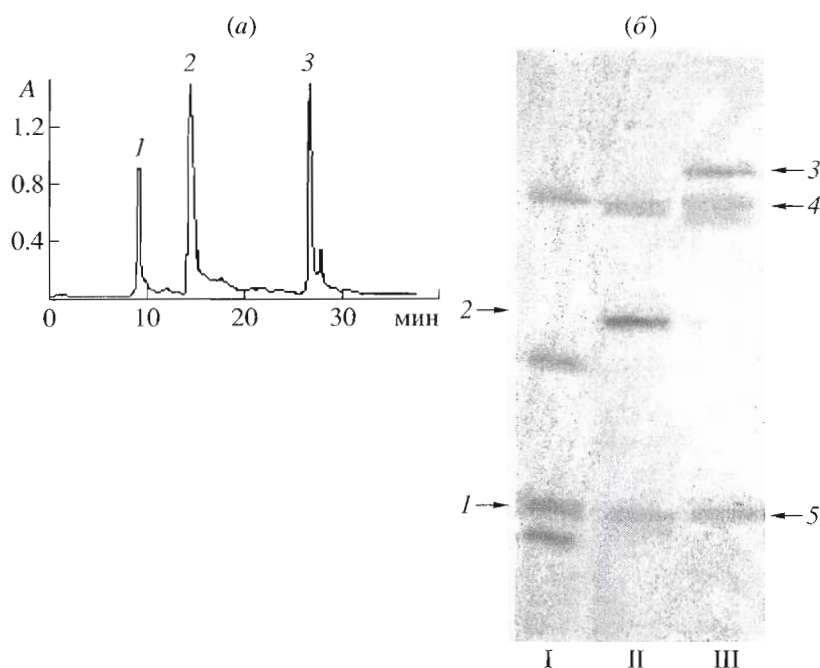


Схема 2.



**Рис. 1.** Обращенно-фазовая хроматограмма реакционной смеси, полученной при взаимодействии  $(5')\text{CGTTTATTp}$  и  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CONH}(\text{Py})_4(\text{CH}_2)_3\text{NEt}_2$  в присутствии трифенилфосфина, диметиламинопиридина и дипиридилдисульфида в DMF. *a* – обращенно-фазовая хроматография (C-18 X-Terra (Waters), 0.05 M LiClO<sub>4</sub>, градиент CH<sub>3</sub>CN 15–45% за 40 мин); *б* – электрофореграмма продуктов реакции в 20% денатурирующем акриламидном геле. Дорожки (I), (II), (III) соответствуют пикам 1, 2 и 3 на хроматограмме. Полосы 1–5 отвечают соответственно исходному олигонуклеотиду; конъюгатам состава 1 : 1 и 2 : 1; ксиленицианолу и бромфеноловому синему.

присоединение двух лигандов с образованием бисфосфамида (схема 2). В АТ-содержащих дуплексах, образованных такого рода конъюгатами, происходит встраивание обоих лигандов в малую бороздку в параллельной ориентации, а стабилизирующий эффект близок к таковому для классической шпильчатой структуры с антипараллельной ориентацией.

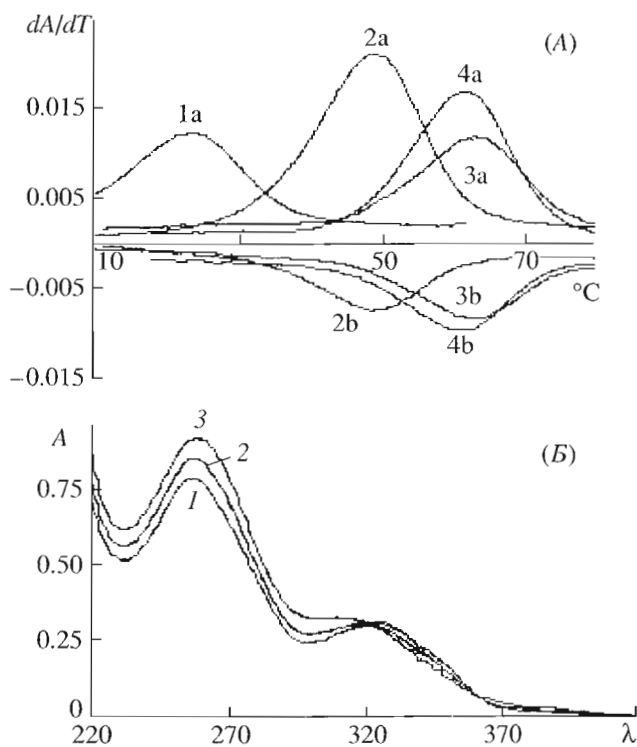
В настоящей работе мы использовали в основном олигопирролкарбоксамидные лиганды, поэтому для их связывания были использованы олигонуклеотиды, содержащие АТ-тракт. Для синтеза моно- и бисфосфамидов были применены подходы, описанные в работах [18, 20]. В случае монофосфамидов более удобной оказывается методика с введением в реакцию с аминоконцептом в водно-органической среде предварительно полученного олигонуклеотида с активированной фосфатной группой [23]. Различия в липофильности моно- и бисконъюгатов существенно сказываются на временах удерживания, что позволяет разделить их, используя обращенно-фазовую ВЭЖХ.

На рис. 1 приведена хроматограмма реакционной смеси, образующейся при синтезе конъюгатов. Минорный первый пик на хроматограмме (дорожка I на электрофореграмме) отвечает смеси исходного олигонуклеотида и двух неидентифицированных продуктов олигонуклеотидной природы,

не содержащих в своей структуре остатка малобороздочного лиганда (предположительно непрореагировавшее активированное производное олигонуклеотида и пирофосфат, образующиеся из 5'-фосфорилированного олигонуклеотида). Пики 2 и 3 соответствуют монофосфамиду и бисфосфамиду (дорожки II и III на рис. 1б).

По этой методике нами получен ряд конъюгатов с малобороздочными лигандами, присоединенными по фосфатной группе олигонуклеотида N-концевой частью лиганда с использованием в качестве линкера аминокaproновой или аминокислоты. На C-конце лиганда находились либо незаряженная этоксигруппа, либо диэтиламинопропильная группа, способная к протонированию, либо положительно заряженная триметиламинопропильная группа. В основном нами были использованы тетрапирролкарбоксамидные лиганды, но для сравнения были также получены конъюгаты, содержащие дипирролкарбоксамидные лиганды.

Влияние конъюгированных лигандов на стабильность ДНК-дуплексов определяли по данным термической денатурации дуплексов, образуемых исследуемыми конъюгатами и комплементарными им олигонуклеотидами. Кривые плавления записывали при длинах волн, близких максимумам поглощения олигонуклеотидной и



**Рис. 2.** А – первые производные кривых плавления дуплексов, образованных олигонуклеотидом ААТАААСГ и олигонуклеотидом СGТТТАТТр, его конъюгатами СGТТТАТТр- $\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}(\text{Py})_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NEt}_2$  (2а, b), СGТТТАТТр [ $-\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}(\text{Py})_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NEt}_2$ ] $_2$  (3а, b) и СGТТТАТТр- $\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}(\text{Py})_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}(\text{Py})_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NEt}_2$  (4а, b). Кривые плавления фиксировались при 260 (а) и 330 нм (b). Б – спектр дуплекса, образованного олигонуклеотидом ААТАААСГ и конъюгатом СGТТТАТТр- $\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}(\text{Py})_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}(\text{Py})_4\text{OC}_2\text{H}_5$ , записанный при 5 (1), 45 (2), 90°С (3). Концентрация олигонуклеотидов  $3 \times 10^{-5}$  М (10 мМ фосфатный буфер рН 7.3, 0.1 М EDTA, 0.1 М NaCl).

лигандной частей конъюгата, соответственно при 260 и 330 нм. В качестве примера на рис. 2 приведены первые производные кривых плавления дуплексов, образованных конъюгатами (5')СGТТТАТТ-О-Р(О)X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> и (5')ААТАААСГ. Присоединение одного или двух тетрапирролкарбоксамидных лигандов или шпилечного лиганда приводит к существенному повышению  $T_{\text{пл}}$ . Плавление олигонуклеотидного дуплекса сопровождается увеличением оптического поглощения в районе 260 нм и уменьшением его при 330 нм (рис. 2А), что также отмечено в работах [14, 20]. Уменьшение оптического поглощения дуплекса при его плавлении обусловлено смещением максимума поглощения лиганда в коротковолновую область с 320–325 до 305–310 нм (рис. 2Б) и является, по нашему мнению, достаточно веским указанием на встраивание лиганда в малую бороздку.

### Влияние природы линкера

В качестве линкера нами использовались  $\gamma$ -аминомасляная или  $\epsilon$ -аминокапроновая кислота. Немодифицированный дуплекс (5')СGТТТАТТ-Тр•(5')ААТАААСГ (дуплекс (1) в таблице) плавится при 20°С. Для дуплексов, включающих монофосфамидный лиганд как с ОEt- (дуплексы (5) и (7)), так и с  $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NEt}_2$ -заместителем на С-конце (дуплексы (2) и (9)), больший стабилизирующий эффект ( $\Delta T$  соответственно 6 и 10°С) наблюдается при использовании  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты по сравнению с  $\gamma$ -аминомасляной кислотой. В то же время для комплекса состава 2 : 1 влияние природы линкера существенно меньше и величина  $\Delta T$  не превышает 3°С (дуплексы (6) и (8), (3) и (10)). Интересно отметить, что наличие G•C-пары, находящейся на конце олигонуклеотидного дуплекса, не препятствует встраиванию одного или двух лигандов в АТ-тракт и увеличению стабильности дуплекса даже при использовании такого короткого линкера, как  $\gamma$ -аминомасляная кислота (дуплексы (25), (26) и (27)).

### Влияние природы С-концевого заместителя

При изучении влияния С-концевого заместителя были рассмотрены лиганды на основе тетрапирролкарбоксамиды, содержащие в качестве линкера  $\gamma$ -аминомасляную кислоту. Для комплексов состава 1 : 1 наблюдается существенное изменение  $T_{\text{пл}}$  соответствующего дуплекса при изменении природы С-концевого заместителя. Наибольший стабилизирующий эффект наблюдается для заместителя  $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NEt}_2$  (дуплекс (9),  $\Delta T = 16^\circ\text{C}$ ). Лиганд, несущий на С-конце нейтральную этокси-группу, повышает  $T_{\text{пл}}$  на 10°С (дуплекс (7)). Для МGB с положительно заряженной триметиламониевой группой повышение величины  $T_{\text{пл}}$  составляет 11°С (дуплекс (11)). Температура плавления дуплексов, включающих бисфосфамидные конъюгаты, зависит от природы заместителей в существенно меньшей степени и изменяется в пределах от 58 до 63°С (дуплексы (10), (8) и (12),  $\Delta T = 38\text{--}43^\circ\text{C}$ ).

### Влияние способа укладки лигандов

Нами рассматривались два способа укладки лигандов в малую бороздку – параллельный (бисфосфамид с двумя присоединенными к концевой фосфатной группе тетрапирролкарбоксамидными остатками) и антипараллельный (монофосфамид с одним присоединенным шпилечным лигандом, содержащим два тетрапирролкарбоксамидных остатка). Из данных таблицы видно, что в случае бисфосфамидов влияние структуры линкерной и С-концевой части МGB невелико и  $\Delta T = 40\text{--}43^\circ\text{C}$ . В то же время для монофосфамидов с присоединенным шпилечным лигандом стабили-

Температуры плавления дуплексов, образованных конъюгатами олигонуклеотидов с МГВ и комплементарными им олигонуклеотидами

№	Дуп-лекс*	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	T <sub>пл</sub> , °С
1	A	O <sup>-</sup>	O <sup>-</sup>	20
2	A	O <sup>-</sup>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	46
3	A	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	60
4	A	O <sup>-</sup>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	58
5	A	O <sup>-</sup>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO(Py) <sub>4</sub> OEt	36
6	A	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO(Py) <sub>4</sub> OEt	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO(Py) <sub>4</sub> OEt	61
7	A	O <sup>-</sup>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> OEt	30
8	A	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> OEt	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> OEt	58
9	A	O <sup>-</sup>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	36
10	A	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	61
11	A	O <sup>-</sup>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> Me <sub>3</sub>	31
12	A	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> Me <sub>3</sub>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> Me <sub>3</sub>	63
13	A	O <sup>-</sup>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> OEt	48
14	A	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> OEt	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> OEt	38
15	A	O <sup>-</sup>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO(Py) <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	27
16	A	O <sup>-</sup>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>2</sub> OEt	26
17	A	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>2</sub> OEt	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>2</sub> OEt	33
18	A	O <sup>-</sup>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	30
19	A	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	46
20	A	O <sup>-</sup>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Im) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	23
21	A	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Im) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Im) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	24
22	A	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Im) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	30
23	A	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CONH(Py) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CONH(Py) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CONH(Py) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CONH(Py) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	37
24	A	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	37
25	B	O <sup>-</sup>	O <sup>-</sup>	16
26	B	O <sup>-</sup>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	35
27	B	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	~NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO(Py) <sub>4</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	58

\* A: (5')CGTTTATT-pX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>, (3')GCAAATAA; B: (5')X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>p-GTATTTG, (3')CATAAAC.

зирующий эффект зависит от природы линкера и заместителя в гораздо большей степени. Так, ΔT для дуплекса (13) составляет 28°C, а для дуплекса (4) – 38°C.

*Характер взаимодействия лиганда с олигонуклеотидным дуплексом в зависимости от протяженности лиганда и числа конъюгированных олигокарбоксамидных фрагментов*

На примере конъюгатов с фосфамидами, содержащими от 2 до 5 пирролкарбоксамидных фрагментов, было показано, что с увеличением числа этих фрагментов повышается T<sub>пл</sub> АТ-содержащего олигонуклеотидного дуплекса [9]. В нашем случае для дуплексов, несущих комплексы состава 1 : 1, содержащие в качестве линкера γ-аминокапроновую кислоту, а на С-конце лиганда группу

NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NEt<sub>2</sub>, ΔT составляет 10 и 17°C для ди- и тетрапирролкарбоксамидного лиганда соответственно (дуплексы (18) и (10)). Для дуплексов с комплексами состава 2 : 1 наблюдаются аналогичные изменения T<sub>пл</sub> (дуплексы (19) и (10), ΔT<sub>пл</sub> = 26 и 41°C).

Подобным образом изменяются и температуры при переходе от дипирролкарбоксамидов к тетрапирролкарбоксамидам, несущим на С-конце этоксигруппу (дуплексы (16), (7) и (17), (8)). Вместе с тем, способы встраивания дипирролкарбоксамидного лиганда, несущего С-концевую ОEt-группу (дуплекс (16)), и лигандов, содержащих тетрапирролкарбоксамидный фрагмент, различаются существенным образом. Если как моно-, так и бис-тетрапирролкарбоксамиды взаимодействуют с олигонуклеотидным дуплексом в малой бороздке [9, 10], то в дуплексе (16), по данным ЯМР-спектроскопии [24], дипирролкарбоксамидный остаток взаимодействует с концевой А•Т-парой за счет стэкинга. Такого

рода взаимодействие приводит к повышению  $T_{пл}$  дуплекса на 6°C (таблица). Близкие изменения  $T_{пл}$  происходят и при введении в С-конец аминобутильной группы ( $\Delta T = 7^\circ\text{C}$ , дуплекс (15)). Наличие диэтиламинопропиламинильного остатка в составе конъюгированного лиганда увеличивает  $\Delta T$  до 10°C (дуплекс (19)). Для дуплексов (17) и (19) с комплексами состава 2 : 1 и ОEt- и  $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NEt}_2$ -заместителями соответственно  $\Delta T$  составляет 13 и 26°C.

Вероятнее всего, наблюдаемые эффекты обуславливаются тем, что дуплексы, несущие конъюгированные дипирролкарбоксамидные лиганды, способны существовать в двух взаимопревращающихся формах – с лигандом, стабилизирующим дуплекс за счет взаимодействия с малой бороздкой (форма 1), или за счет стэкинг-взаимодействия с концевой А•Т-парой дуплекса (форма 2). В зависимости от природы С-концевой части лиганда соотношение этих форм и соответственно  $T_{пл}$  изменяется. По данным ЯМР-спектроскопии, дуплекс (16) существует практически полностью в виде формы 1 [24]. Судя по величине  $T_{пл}$ , аналогичная картина наблюдается и для дуплекса (15). Большая величина  $T_{пл}$  для дуплекса (18) может указывать на больший вклад формы 2 в структуру дуплекса. Дуплексы (17) и (19), несущие комплексы состава 2 : 1 с конъюгированными дипирролкарбоксамидными фрагментами, имеют более высокую  $T_{пл}$  по сравнению с дуплексами (16) и (18) соответственно. Вероятно, в данном случае могут реализоваться различные варианты взаимодействия лиганда с олигонуклеотидным дуплексом – с встраиванием одного из лигандов в малую бороздку дуплекса и стэкинг-взаимодействием второго лиганда с концевой А•Т-парой. Другой вариант – это встраивание обоих лигандов в малую бороздку. Судя по величине  $\Delta T$ , для дуплекса (19) (26°C) этот дуплекс существует в основном в виде именно этой формы.

Известно, что олигоимидазолкарбоксамиды слабо взаимодействуют с малой бороздкой АТ-тракта ДНК-дуплекса [1, 2]. Именно поэтому  $\Delta T$  для дуплексов (20) и (21), включающих тетраимидазолкарбоксамидные комплексы состава 1 : 1 и 2 : 1, невелика, составляет всего 3–4°C и обусловлена, вероятно, лишь стэкинг-взаимодействием. Дуплекс (22), несущий бисфосфамид, содержащий в своей структуре один тетраимидазолкарбоксамидный и один тетрапирролкарбоксамидный остаток, имеет большую  $T_{пл}$ , чем исходный дуплекс (1) ( $\Delta T = 10^\circ\text{C}$ ), но меньшую  $T_{пл}$ , чем содержащий не только два (дуплекс (10)), но и лишь один тетрапирролкарбоксамидный остаток (дуплекс (9)).

Интересно отметить тот факт, что введение более двух тетрапиррольных фрагментов в состав конъюгата приводит к дестабилизации включающего его дуплекса. Так, наличие в дуплексе (23) двух шпилечных лигандов снижает его  $T_{пл}$  отно-

сительно  $T_{пл}$  дуплекса (4), содержащего один шпилечный лиганд ( $\Delta T = 28$  и  $17^\circ\text{C}$  соответственно). Для промежуточного варианта, когда бисфосфамид образуют два разных лиганда – один шпилечной структуры, а второй содержит только половину шпильки, наблюдается такая же ситуация (дуплекс (24),  $\Delta T = 17^\circ\text{C}$ ). Аналогичная картина имеет место и для дуплексов (13) и (14), когда присоединение одного шпилечного лиганда повышает  $T_{пл}$  на  $28^\circ\text{C}$ , а еще одного – к понижению  $T_{пл}$  на  $10^\circ\text{C}$ .

Эти данные дают основания полагать, что в исследуемом нами варианте в малую бороздку возможно встраивание не более двух тетрапирролкарбоксамидных остатков (в параллельной или антипараллельной ориентации) и существенно меньшую вероятность образования комплексов состава 3 : 1 или 4 : 1, о чем сообщалось в работах [25, 26]. Более того, присутствие дополнительного лиганда, не встраивающегося в малую бороздку, приводит к уменьшению стабилизирующего эффекта лиганда, лежащего в малой бороздке, аналогично влиянию дополнительного тетраимидазолкарбоксамидного остатка на  $T_{пл}$  дуплекса, стабилизированного тетрапирролкарбоксамидным остатком. Такого рода влияние на стабильность олигонуклеотидного дуплекса, по нашему мнению, может оказаться полезным при дизайне конъюгатов, поскольку должно увеличивать сайт-специфичность связывания лигандов в составе конъюгата состава 1 : 2 (бисфосфамидов).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерчески доступные реактивы и растворители, при необходимости подвергая их дополнительной очистке по стандартным методикам. Олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы в лаборатории медицинской химии Новосибирского института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН или получены от фирмы “Eurogentec” (Бельгия).

Синтез лигандов малой бороздки, их выделение, анализ структуры MGB с помощью ЯМР- и масс-спектрометрии проводили согласно [9–11, 27].

**Синтез конъюгатов олигодезоксирибонуклеотид-MGB.** Для ковалентного присоединения MGB к олигодезоксирибонуклеотиду мы использовали ранее описанные методики [20, 23]. Для синтеза бисфосфамидов с одинаковыми лигандами олигонуклеотид осаждали цетилтриметиламмонийбромидом, сушили, растворяли в DMSO, активировали смесью трифенилфосфина, дипиридилдисульфида и диметиламинопиридина. Затем к смеси добавляли раствор лиганда в DMSO, содержащем 5% триэтиламина и выдерживали 6–18 ч при комнатной температуре.

При получении монофосфамидов активацию фосфатной группы проводили в DMSO, присое-

динение лиганда – в смеси DMSO–вода. Для синтеза конъюгатов, содержащих две разные молекулы MGB, 0.05–0.5 мкмоль конъюгата, содержащего одну молекулу MGB, осаждали цетилтриметиламмонийбромидом, сушили, растворяли в DMSO и вновь активировали фосфорамидатную группу с помощью смеси трифенилфосфин–2,2'-дипиридилдисульфид–4,4'-диметиламинопиридин, как описано ранее [23], затем добавляли избыток MGB (2–3 мг) непосредственно в реакционную массу и смесь инкубировали при комнатной температуре 8–12 ч.

Полученные конъюгаты выделяли с помощью ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой C-18 X-Terra (Waters, 7 мкм, 300 × 7.8 мм) в линейном градиенте ацетонитрила (5–40%, скорость элюции 1.0 мл/мин) в 0.05 М перхлорате лития, используя хроматографическую систему 1100 (Agilent Technologies).

**Эксперименты по термической денатурации дуплексов** проводили на спектрометре Kontron Uvikon 940 (BioTek) с термостатированными кюветами (длина оптического пути 1 см). Концентрация каждой из цепей дуплекса составляла 1.5 мкМ, в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7.3), 0.1 М NaCl, 0.1 мМ EDTA. Изменение температуры кюветы осуществляли со скоростью 0.2°C/мин, спектр поглощения записывали каждые 200 с. Обработку кривых плавления осуществляли с помощью программ KaleidaGraph и Microsoft Excel. Ряд экспериментов по термической денатурации проводили в приборе для микроденатурации ДНК-дуплексов в соответствии с методом [9].

Работа выполнена при финансовой поддержке ЕЭС (European Community) (грант INTAS 01-0638), Министерства иностранных дел Франции (грант EGIDE 04542ND), Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 04.70043-69), индивидуальных грантов Национального центра научных исследований, Франция (“poste rouge” для А.Н. Синякова) и Национального музея естественной истории, Париж, Франция (для В.А. Рябинина). Авторы благодарны К. Ко и А. Блон (Национальный музей естественной истории, Париж, Франция) за ЯМР-спектры синтезированных лигандов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dervan P.B. // *Bioorg. Med. Chem.* 2001. V. 9. P. 2215–2235.
2. Dervan P.B., Edelson B.S. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2003. V. 13. P. 284–299.
3. Pelton J.G., Wemmer D.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 5723–5727.
4. White S., Szewczyk W., Turner J.M., Baird E.E. // *Nature.* 1998. V. 391. P. 468–471.
5. White S., Turner J.M., Szewczyk J.W., Baird E.E., Dervan P.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. V. 121. P. 260–261.
6. Urbach A.R., Szewczyk J.W., White S., Turner J.M., Baird E.E., Dervan P.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. V. 121. P. 11621–11629.
7. Turner J.M., Swalley S.E., Baird E.E., Dervan P.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V. 120. P. 6219–6226.
8. Nguyen D.H., Szewczyk J.W., Baird E.E., Dervan P.B. // *Bioorg. Med. Chem.* 2001. V. 9. P. 7–17.
9. Sinyakov A.N., Lokhov S.G., Kutuyavin I.V., Gamper H.B., Meyer R.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 4995–4996.
10. Синяков А.Н., Рябинин В.А., Серегин С.В., Горбунов Ю.А., Лохов С.Г., Кутявин И.В., Гампер Х.Б., Майер Р.Б. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 544–552.
11. Рябинин В.А., Горбунов Ю.А., Синяков А.Н. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 539–543.
12. Lukhtanov E.A., Kutuyavin I.V., Gamper H.B., Meyer R.B., Jr. // *Bioconjug. Chem.* 1995. V. 6. P. 418–426.
13. Afonina I., Kutuyavin I., Lukhtanov E., Meyer R.B., Gamper H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 3199–3204.
14. Levina A.S., Metelev V.G., Cohen A.S., Zamecnik P.C. // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1996. V. 6. P. 75–85.
15. Afonina I., Zivarts M., Kutuyavin I., Lukhtanov E., Gamper H., Meyer R. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 2657–2660.
16. Robles J., Rajur S.B., Mclaughlin L.W. // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. P. 5820–5821.
17. Szewczyk J.W., Baird E.E., Dervan P.B.J. // *Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. P. 6778–6779.
18. Синяков А.Н., Рябинин В.А., Гримм Г.Н., Буторин А.С. // *Молекул. биология.* 2001. Т. 35. С. 298–308.
19. Bourtine A.S., Ryabinin V.A., Novopashina D.S., Venyaminova A.G., Helene C., Sinyakov A.S. // *Nucleosides Nucleotides. Nucl. Acids.* 2003. V. 22. P. 1943–1965.
20. Рябинин В.А., Денисов А.Ю., Пышный Д.В., Абрамова Т.В., Синяков А.Н., Власов В.В. // *Докл. РАН.* 1999. Т. 368. С. 836–838.
21. Синяков А.Н., Буторин А.С., Элен К., Пышный Д.В., Рябинин В.А. // *Биоорганическая химия.* 2004. Т. 30. С. 558–560.
22. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Мальцева Т.В., Халимская Л.М. // *Биоорганическая химия.* 1989. Т. 15. С. 1246–1252.
23. Grimm G.N., Bourtine A.S., Helene C. // *Nucleosides Nucleotides. Nucl. Acids.* 2000. V. 19. P. 1943–1965.
24. Денисов А.Ю., Рябинин В.А., Пышный Д.В., Абрамова Т.В., Синяков А.Н. // *Журн. структ. химии.* 2001. Т. 42. С. 92–98.
25. Zasedatelev A.S., Borodulin V.B., Grokhovsky S.L., Nikitin A.M., Salmanova D.V., Zhuze A.L., Gursky G.V., Shafer R.H. // *FEBS Lett.* 1995. V. 375. P. 304–306.
26. Blasko A., Bruice T.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 10018–10022.
27. Рябинин В.А., Синяков А.Н. // *Биоорганическая химия.* 1998. Т. 24. С. 601–607.

## Effect of Structural Factors on the Stability of Duplexes Formed by Oligonucleotide Conjugates with Minor Groove Binders

V. A. Ryabinin<sup>##</sup>, A. S. Butorin<sup>\*\*</sup>, K. Elen<sup>\*\*</sup>, A. Yu. Denisov<sup>\*\*\*</sup>,  
D. V. Pyshnyi<sup>\*\*\*</sup>, and A. N. Sinyakov<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: (3832) 30-4653; e-mail: ryabinin@niboch.nsc.ru

<sup>\*</sup>Institute of Molecular Biology, Vector State Research Center of Virology and Biotechnology,  
pos. Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 630559 Russia

<sup>\*\*</sup>Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

<sup>\*\*\*</sup>Novosibirsk Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,  
prosp. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

The effect of structural factors on the stability of duplexes formed by DNA minor groove binders conjugated with oligonucleotide mono- or diphosphoramidates of the general formula Oligo-MGB<sub>m</sub> (where Oligo is an oligonucleotide;  $m = 1$  or  $2$ ; MGB is  $-L(Py)_2R$ ,  $L(Py)_4R$ ,  $-L(Im)_4R$ , or  $-L(Py)_4NH(CH_2)_3CO(Py)_4R$ ; Py is a 4-aminopyrrol-2-carboxylic acid residue, L is a  $\gamma$ -aminobutyric acid or an  $\epsilon$ -aminocaproic acid residue, R = OEt,  $NH(CH_2)_6NEt_2$ , or  $NH(CH_2)_6N^+Me_3$ ) was studied by the method of thermal denaturation. The mode of binder interaction with minor groove depends on the conjugate structure; it may be of the parallel head to head type for bisphosphoramidates and of the antiparallel head to tail type for monophosphoramidates of a hairpin structure. The effects of the duplexes with parallel orientation (bisphosphoramidates, MGB is  $L(Py)_4R$ ,  $m = 2$ ) and those of the hairpin structure with the antiparallel orientation (monophosphoramidates, MGB is  $L(Py)_4(CH_2)_3CO(Py)_4R$ ,  $m = 1$ ) on  $T_m$  values were close. The influence of the linker (L) and substituent (R) structures upon  $T_m$  was more pronounced for monophosphoramidate (MGB is  $L(Py)_nR$ ,  $m = 1$ ) than for bisphosphoramidate (MGB is  $L(Py)_nR$ ,  $m = 2$ ). No more than two oligopyrrolcarboxamide residues (either in parallel or antiparallel orientations) can be incorporated into the duplex minor groove. Moreover, it was shown by the example of monophosphoramidates (Oligo- $L(Py)_4R$  and Oligo- $L(Py)_4NH(CH_2)_3CO(Py)_4R$ ) that the addition of a second ligand capable of incorporation into the minor groove increased  $T_m$  of the corresponding duplex in comparison with the duplex formed by the starting monophosphoramidate. At the same time, the introduction of the ligand incapable of incorporating decreased the  $T_m$  value. The mode of interaction of the conjugated ligand with the oligonucleotide duplex is determined by its structure. For example, dipyrrolcarboxamide containing an ethoxy group at the ligand C-end stabilizes the duplex due to the stacking interaction with the terminal A•T pair, whereas tetrapyrrolcarboxamides stabilize the duplex by incorporation into the minor groove. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* conjugate, distamycin, DNA minor groove binders, oligonucleotide, sequence-specific polyamides