



УДК 577.113.6

ПЕПТИДО-НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ ФОСФОНАТНЫЕ АНАЛОГИ: СИНТЕЗ И ГИБРИДИЗАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА

© 1998 г. В. А. Ефимов[#], А. А. Бурякова, М. В. Чуб, О. Г. ЧахмахчеваИнститут биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 27.02.98 г. Принята к печати 03.04.98 г.

Описан синтез ряда ДНК-миметиков, представляющих собой пептидо-нуклеиновые кислоты, фосфонатные аналоги пептидо-нуклеиновых кислот и их гибриды. Разработаны препаративные методы получения соответствующих мономеров и методики автоматического твердофазного синтеза олигомеров-миметиков. Получены модификации фосфонатных аналогов пептидо-нуклеиновых кислот, в частности хиральные производные и производные с дополнительными гидроксильными группами в боковых цепях аналогов, а также пиренсодержащие производные пептидо-нуклеиновых кислот и их фосфонатных аналогов. Исследована способность полученных олигомеров специфически гибридизоваться с комплементарными цепями ДНК и РНК. Показано, что фосфонатные аналоги пептидо-нуклеиновых кислот и их гибриды с пептидо-нуклеиновыми кислотами способны образовывать комплексы с комплементарными фрагментами ДНК и РНК, причем стабильность комплексов увеличивается пропорционально увеличению количества остатков пептидо-нуклеиновых кислот в цепи миметика. Последнее свойство наряду с хорошей растворимостью в воде создает предпосылки для дальнейшего их изучения как потенциальных антисенс- и антигенных реагентов.

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

За последние 20 лет синтетические олигонуклеотиды уверенно вошли в практику как уникальные инструменты для исследований в области молекулярной биологии и биотехнологии. Они широко применяются при выделении генов из природных источников и определении их первичной структуры, в качестве зондов и праймеров, как специфические мутагены в белковой и генетической инженерии, а также в качестве строительного материала при получении искусственных генов и регуляторных фрагментов нуклеиновых кислот. Одной из сфер применения синтетических олигонуклеотидов и в особенности их аналогов является использование в качестве специфических ингибиторов экспрессии генов и репликации вирусов, что создало предпосылки для разработки на их основе лекарственных средств нового поколения. С этой целью было предложено внушительное число аналогов нуклеиновых кислот [1], в том числе новый класс соединений, известный как пептидные или полиамидные аналоги нуклеиновых кислот (ПНК) [2].

Классический вариант ПНК состоит из ахиральных мономерных субъединиц, полученных на основе *N*-(2-аминоэтил)глицина, несущего в виде боковых цепей гетероциклические основания НК (рис. 1). Ввиду высокой аффинности к ДНК и РНК, а также устойчивости к деградации внутриклеточными протеиназами, эти соединения привлекли внимание исследователей как потенциальные субстанции для терапевтического использования. Однако биологическое применение ПНК ограничивается их плохой растворимостью в воде, склонностью к самоагрегации, неспособностью активировать РНКазу *H* и плохим проникновением сквозь клеточные мембраны [3, 4]. При физиологических значениях рН молекулы ПНК не заряжены, что, с одной стороны, приводит к их плохой растворимости в воде, а с другой – усиливает их необычные гибридационные свойства. Был предпринят ряд попыток улучшить растворимость ПНК, в том числе за счет получения гибридов ПНК-ДНК [4–8]. Было показано, что подобные химеры специфически гибридизуются с НК, однако ввиду сильного различия структур ДНК и ПНК стабильность комплексов, образованных ПНК-ДНК-гибридами с НК, сильно зависит от количества, состава и взаимного расположения остатков нуклеотидов и мономеров ПНК в цепи гибридного олигомера.

Сокращения: ПНК – пептидо-нуклеиновые кислоты; фПНК – фосфонатные аналоги пептидо-нуклеиновых кислот; DBU – 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундек-7-ен; TPS-NT – 2,4,6-тризопропилбензолсульфонил-3-нитро-1,2,4-триазолид; FPLC – быстрая жидкостная хроматография, MMTg – 4-монометокситритил; DMTg – 4,4'-диметокситритил.

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

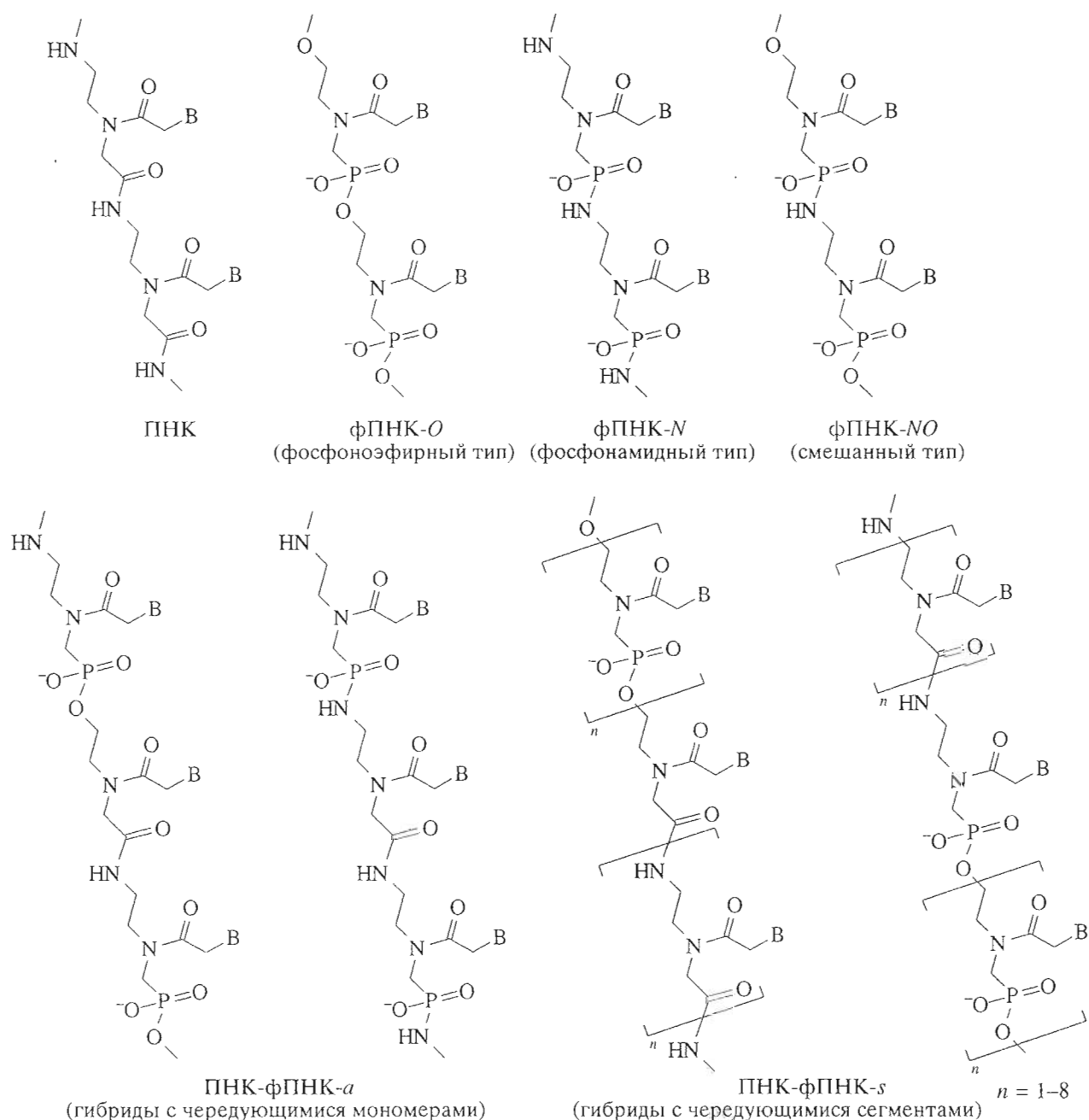


Рис. 1. Структуры ДНК-миметиков: пептидо-нуклеиновых кислот (ПНК), фосфонатных аналогов пептидо-нуклеиновых кислот (фПНК) и их гибридов различного типа.

Недавно в качестве альтернативных соединений, которые были бы лишены этих недостатков, был предложен новый класс ДНК-миметиков, представляющий собой фосфонатные аналоги ПНК (фПНК) (рис. 1) [9–12]. Эти молекулы построены на основе *N*-(2-гидроксиэтил)- или *N*-(2-аминоэтил)фосфоноглицина, несущего пиримидиновые и пуриновые основания в виде боковых цепей. Предварительное изучение свойств фПНК олигомеров показало, что они полностью устойчи-

вы к гидролизу эндо- и экзонуклеазами, а наличие отрицательных зарядов в их остове способствует прекрасной растворимости в воде. Кроме того, эти молекулы способны специфически гибридизоваться с комплементарными последовательностями НК, хотя температуры плавления образующихся при этом комплексов ниже, чем у подобных комплексов, образованных ПНК-олигомерами [12].

Поскольку молекулы ПНК и фПНК – изостеры, логическим продолжением этих исследова-

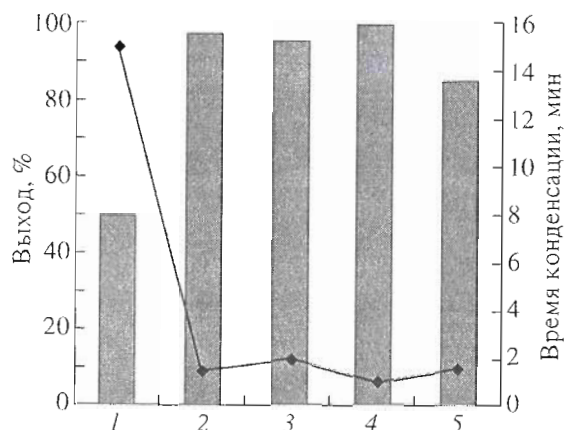


Рис. 2. Сравнение выходов димеров и скорости образования фосфонодиэфирной связи при взаимодействии фПНК-мономера (Vб), содержащего различные фосфонатзащитные группы: 4-нитрофенилэтильную (1), фенильную (2), 2-метилфенильную (3) и мономера (Xб) (4, 5), с OH-компонентом (VIб) (1–4) или NH₂-компонентом (VIa) (5). Реакции проводились в ацетонитриле с использованием 0.025 М растворов мономеров и 0.03 М раствора TPS-NT в присутствии 4-метоксипиридин-*N*-оксида (0.06 М) (1–3) или пиридина (20%) (4, 5).

ний стал синтез химерных олигомеров, содержащих мономеры обоих типов [12, 13]. Нами были получены такие химеры, состоящие либо из чередующихся сегментов, содержащих по несколько мономерных остатков ПНК или фПНК, либо из чередующихся мономеров ПНК и фПНК, и включающие все четыре гетероциклических основания ДНК [12]. Было показано, что химеры ПНК-фПНК обладают свойствами, сочетающими высокие гибридизационные характеристики ПНК с хорошей растворимостью в воде фПНК, и, таким образом, улучшают характеристики обоих этих аналогов ДНК [12, 13].

Настоящее сообщение посвящено синтезу ряда новых вариантов молекул фПНК, а также усовершенствованию методологии препаративного синтеза соединений, используемых для получения олигомеров ПНК, фПНК и их гибридов, и дальнейшему изучению свойств этих ДНК-миметиков.

ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ МОНОМЕРНЫХ СИНТОНОВ ДЛЯ СИНТЕЗА фПНК-ОЛИГОМЕРОВ

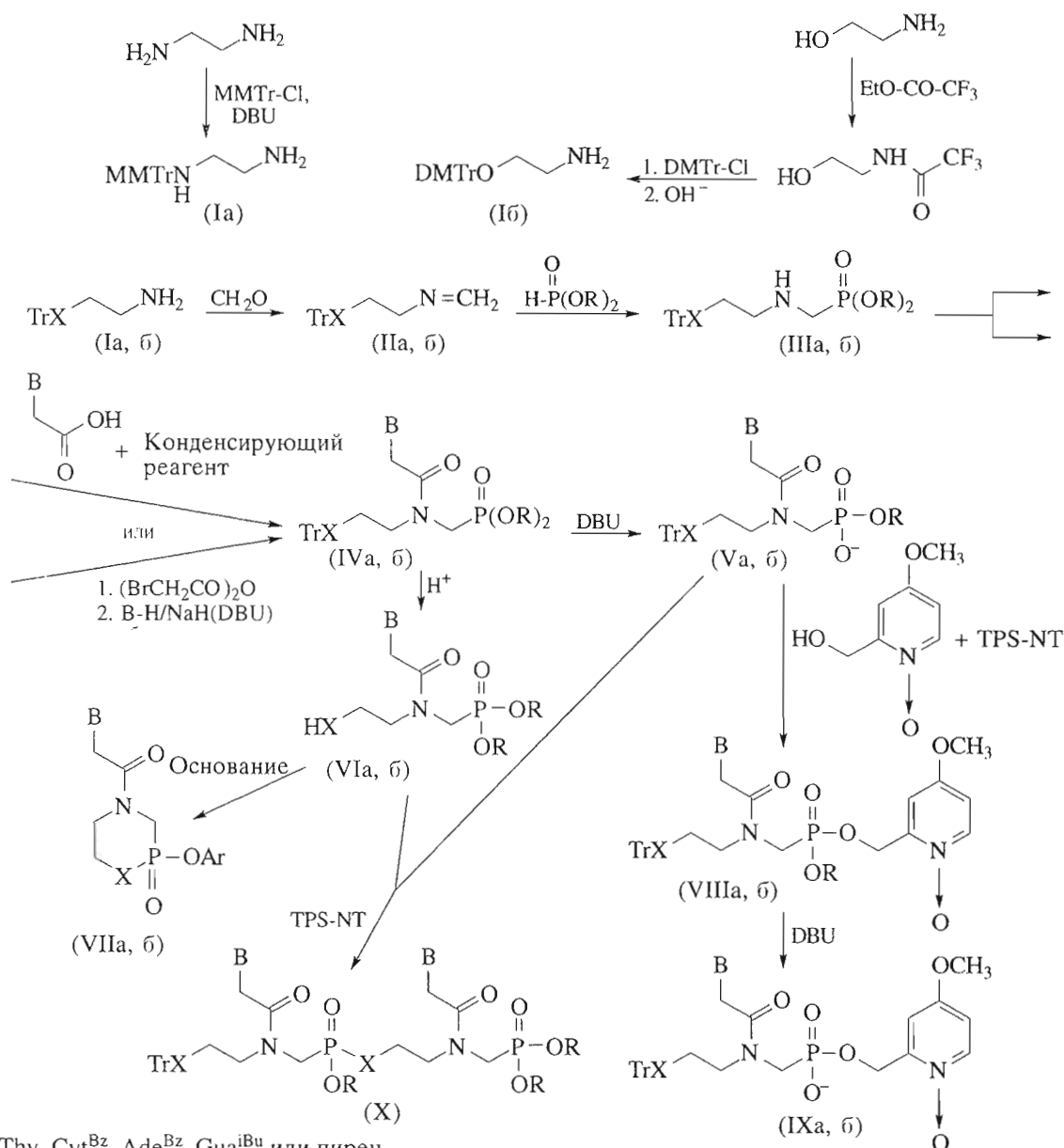
Для создания фосфонодиэфирной связи между фПНК-мономерами нами была выбрана хорошо разработанная методология фосфотриэфирного синтеза ДНК [14, 15]. Подход к получению фПНК-мономеров, содержащих защитные группы, совместимые с этим методом синтеза, был основан на получении универсального промежуточного соединения (III), представляющего со-

бой *O*- и *P*-защищенный *N*-(гидроксиэтил)- или *N*- и *P*-защищенный *N*-(аминоэтил)аминометилфосфонат, к которому в качестве боковой цепи может быть присоединено любое гетероциклическое основание.

Ключевой стадией в синтезе этого интермедиата является образование системы связей P–C–N–H с помощью реакции Кабачника–Филдса между диалкил- или диарилфосфитом и иминным производным (II), предварительно полученным конденсацией формальдегида с 1-(*O*-диметокситритил)-2-аминоэтанолом (Iб) или *N*-(монометокситритил)этилендиамином (Ia) (схема 1). Дальнейшее ацилирование интермедиата (III) бромуксусным ангидридом в присутствии *N*-метилморфолина с последующим присоединением гетероциклического основания давало полностью блокированный мономер (IV), селективное удаление с которого одной из *P*-защитных групп приводило к получению моноэфира фосфоната (V), представляющего собой *P*-компонент, аналогичный *P*-компоненту для триэфирного синтеза олигонуклеотидов. В то же время удаление тритильной защитной группы с соединения (IV) давало возможность получить гидроксильный (или амино-) компонент (VI) для проведения последующей реакции конденсации между двумя мономерными производными в растворе. В качестве *P*-защитных групп нами были опробованы как ароматические (фенильная, 2-метилфенильная), так и алкильные (2-цианэтильная и 4-нитрофенилэтильная [11, 16]) группы.

Сравнение эффективности образования фосфонодиэфиров из полученных нами мономеров (V), содержащих различные фосфонатные защитные группы, проводилось на примере реакции конденсации их с гидроксильным компонентом (VIб) с образованием димера (Xб) в растворе в присутствии конденсирующего реагента, в качестве которого использовался TPS-NT (рис. 2). Реакция проводилась в ацетонитриле в присутствии 4-метоксипиридин-*N*-оксида в качестве нуклеофильного катализатора [14]. При этом в случае соединений, имеющих фенильные защитные группы, уже за 1–2 мин наблюдалось образование фосфонодиэфира (Xб) с выходами до 95%, тогда как мономеры, имеющие алкильные *P*-защитные группы, реагировали гораздо медленнее, давая через 15 мин выходы не более 50% и значительное количество побочных продуктов вследствие протекания побочной реакции сульфонилования при взаимодействии конденсирующего реагента с компонентом (VIб).

Исследование устойчивости соединений (VI), имеющих различные *P*-защитные группировки показало, что при действии оснований (в частности, пиридина или триэтиламина) на мономер, содержащий *P*-фенильную защитную группу, в значительной степени происходит образование цик-



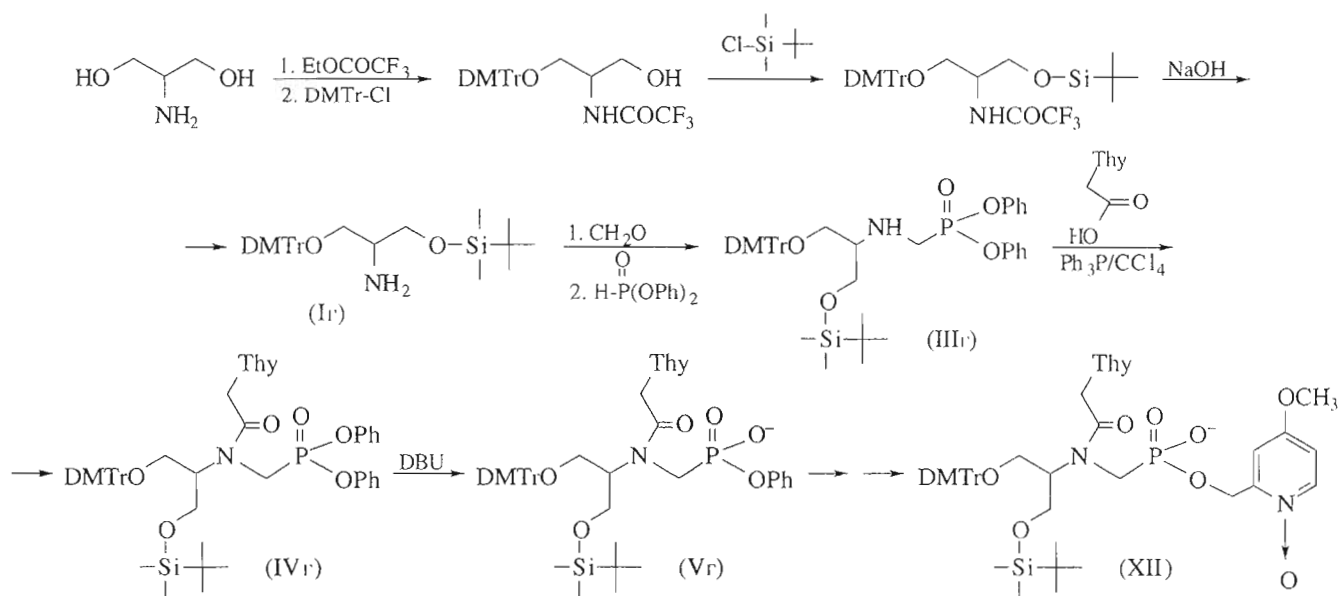
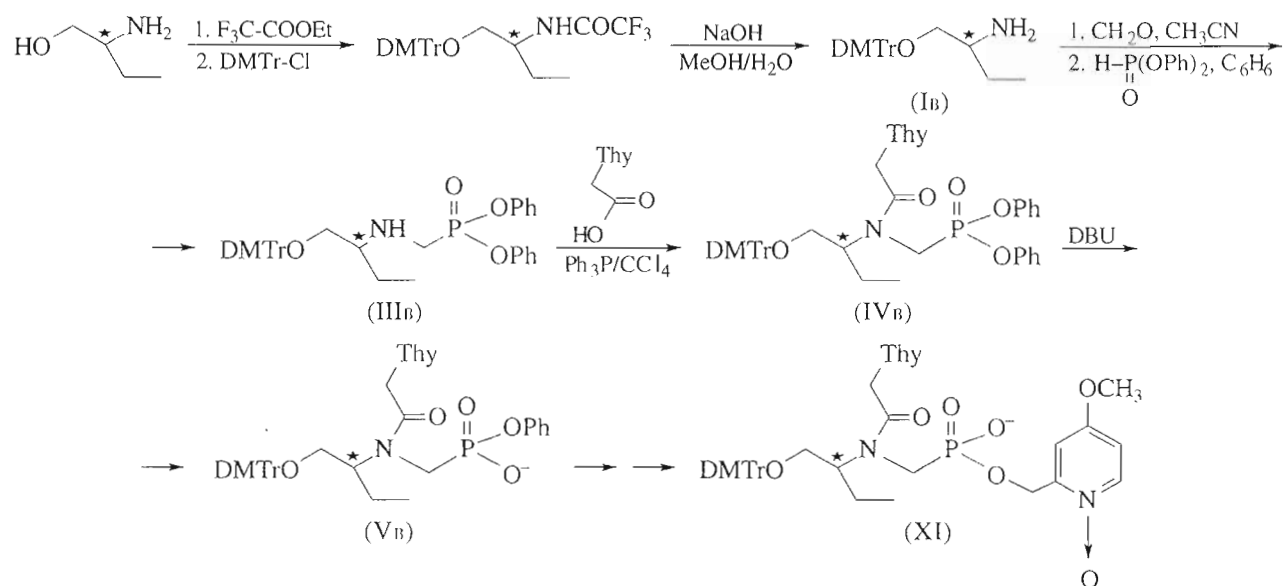
B = Thy, Cyt^{Bz}, Ade^{Bz}, Gua^{iBu} или пирен
 Tr = MMTr (а) или DMTr (б)
 X = NH (а) или O (б)

Конденсирующий реагент = DCC или Ph₃P/CCl₄
 R = Ar (Ph, 2-MePh) или Alk (4-нитрофенилэтил, 2-цианэтил)

Схема 1.

лофосфоната (VII). Замена фенильной защитной группы на 2-метилфенильную приводила к некоторому снижению количества этого побочного продукта. В то же время образование циклофосфонатов из соединений (VI), содержащих алкильные P-защитные группировки, не было обнаружено. Диэфирная фосфонатная связь в димере (X), содержащем арильные P-защитные группировки, также оказалась нестабильной в основных условиях. Подобно соответствующим мономерам, здесь также наблюдалось образование циклофосфонатов, что снижало выходы синтезированных из них олигомеров.

В качестве возможного решения этой проблемы для защиты фосфонатной функции нами была предложена 4-метокси-1-оксидо-2-пиколильная группа, ранее успешно использованная как P-защитная для фосфотриэфирного метода синтеза олигонуклеотидов [15]. Синтез производного (IX) осуществлялся в две стадии (схема 1). Сначала мономер (V) конденсировался с 2-гидрокси-4-метокси-1-оксидопиридином в присутствии конденсирующего реагента с получением фосфодиэфира (VIII), а затем действием водного DBU селективно удалялась фенильная группа. 4-Метокси-1-оксидо-2-пиколильная группа оказалась



полностью устойчивой в условиях реакции конденсации между мономерами и в основных условиях. Кроме того, она значительно увеличивала скорость реакции этерификации фосфонатного остатка как эффективный внутримолекулярный *O*-нуклеофильный катализатор. Исследование скорости образования фосфонатной диэфирной связи между мономером (IXб) и гидроксильным компонентом (VIб) в растворе в присутствии TPS-NT показало, что реакция завершается с практически количественным выходом за 1 мин. Синтез димеров в растворе из мономеров типа

(IXа) и (VIа) показал, что реакция образования фосфоамидной связи под действием TPS-NT завершается за 1.5 мин с выходами около 85% (рис. 2).

Впоследствии схема синтеза мономеров (IXа,б) была нами усовершенствована. В частности, для присоединения гетероциклического основания к универсальному интермедиату (III) оказалось более удобно использовать тимин-1-, *N*⁴-бензоилцитозин-1-, *N*²-изобутирилгуанин-9- или *N*⁶-бензоиладенин-9-метиленакарбоновую кислоту в присутствии конденсирующего реагента, как это было описано для ГНК-мономеров [5, 17]. Получение

производных первых трех гетероциклов было достигнуто с хорошими выходами в присутствии DCC, однако этот конденсирующий реагент оказался практически неэффективен для присоединения *N*⁶-бензоиладенин-9-метилкарбоновой кислоты, введение которой в интермедиат (III) было осуществлено с помощью трифенилфосфина в присутствии четыреххлористого углерода (схема 1). Как показали наши эксперименты, этот реагент может быть столь же успешно использован и для присоединения других гетероциклических оснований.

Помимо этого был осуществлен синтез оптически активного фПНК мономера, содержащего этильную группу в боковой цепи *N*-(2-гидроксиэтил)фосфоноглицинового остова. Хиральный тиминсодержащий мономер (XI) был получен исходя из *R*(-)-2-амино-1-бутанола аналогично ахиральному мономеру (VIII) (схема 2). Синтез второго модифицированного фПНК-мономера (XII), содержащего дополнительную OH-группу в боковой цепи, был осуществлен исходя из серинола, как показано на схеме 3. Оба эти мономера использовались нами для синтеза модифицированных тиминовых олиго-фПНК. Замена гетероциклического основания на остаток пирена позволила получить молекулы фПНК, содержащие этот флуорофор.

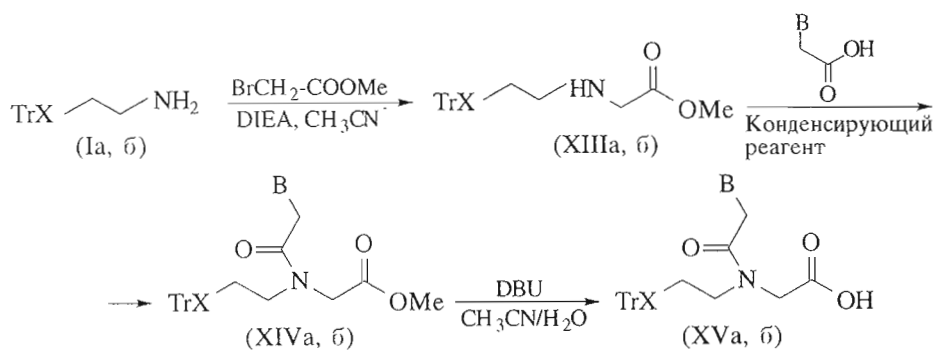
СИНТЕЗ ПНК-МОНОМЕРОВ

Для получения ПНК-олигомеров и их гибридов нами были использованы мономеры типа (XV) (схема 4), содержащие набор защитных групп, совместимый со стандартными условиями синтеза олигонуклеотидов. Синтез ПНК-олигомеров из мономеров типа (XVa), в которых для защиты аминокислотной функции использовалась удаляемая в кислых условиях монометокситритильная

защитная группа, был описан ранее несколькими группами авторов [17–19]. Модифицированные мономеры ПНК, представляющие собой производные *N*-(2-гидроксиэтил)глицина (XVб), были предложены как линкеры при синтезе гибридов ДНК и ПНК [6, 7]. Препаративный синтез этих соединений проводился нами по оригинальной упрощенной методике, представленной на схеме 4. Для получения ПНК-мономеров на основе *N*-(2-аминоэтил)глицина (XVa) исходным соединением явился этилендиамин, который избирательно монометокситритилировался по одной из аминогрупп с образованием соединения (Ia). Это соединение далее легко превращалось в метиловый эфир *N*-(*N*-монометокситритил-2-аминоэтил)глицина (XIIIa), представляющий собой универсальный интермедиат для введения гетероциклических оснований, которое осуществлялось так же, как описано выше для фПНК, с последующим удалением метильной защитной группы с карбоксильной функции действием водного DBU, причем последние три стадии проводились *in situ* без выделения промежуточных соединений. Подобным же образом из этаноламина получали ПНК-мономеры типа (XVб). Применение данной схемы синтеза позволило существенно упростить процедуру получения ПНК-мономеров при сохранении высоких выходов и чистоты целевых соединений. Синтез производных типа (XVa,б), содержащих вместо гетероциклического основания остаток пирена, проводился аналогично, исходя из интермедиатов (XIIIa,б) и 1-пиренилуксусной кислоты.

СИНТЕЗ ОЛИГОМЕРОВ ПНК, фПНК И ИХ ГИБРИДОВ

Как уже отмечалось выше, использованные нами для синтеза фПНК- и ПНК-олигомеров и их гибридов мономеры имели набор защитных



Конденсирующий реагент = DCC или $\text{Ph}_3\text{P}/\text{CCl}_4$
 B = Thy, Cyt^{Bz}, Ade^{Bz}, Gua^{iBu} или пирен
 TrX = MMTTrNH (а) или DMTrO (б)

Схема 4.

групп, совместимый с условиями фосфотриэфирного метода синтеза ДНК, а именно диметокси- или монометокситритильную группу на гидроксильной или аминофункции соответственно и ацильные защитные группы на аминофункциях гетероциклических оснований. Фосфонатные производные имели также алкильные *O*-каталитические *P*-защитные группировки. Исходя из

этих мономеров был осуществлен синтез ряда димерных синтонов, представляющих собой как ПНК-фПНК-гибриды (XVI), (XVII), так и гибриды двух различных типов фПНК-мономеров (XVIII) (схема 5). Синтез димеров (XVI) и (XVII) был описан нами ранее [12]. Димер (XVIII) получали из мономеров (VIa,б) и (IXa,б). В качестве конденсирующего реагента для образования фос-

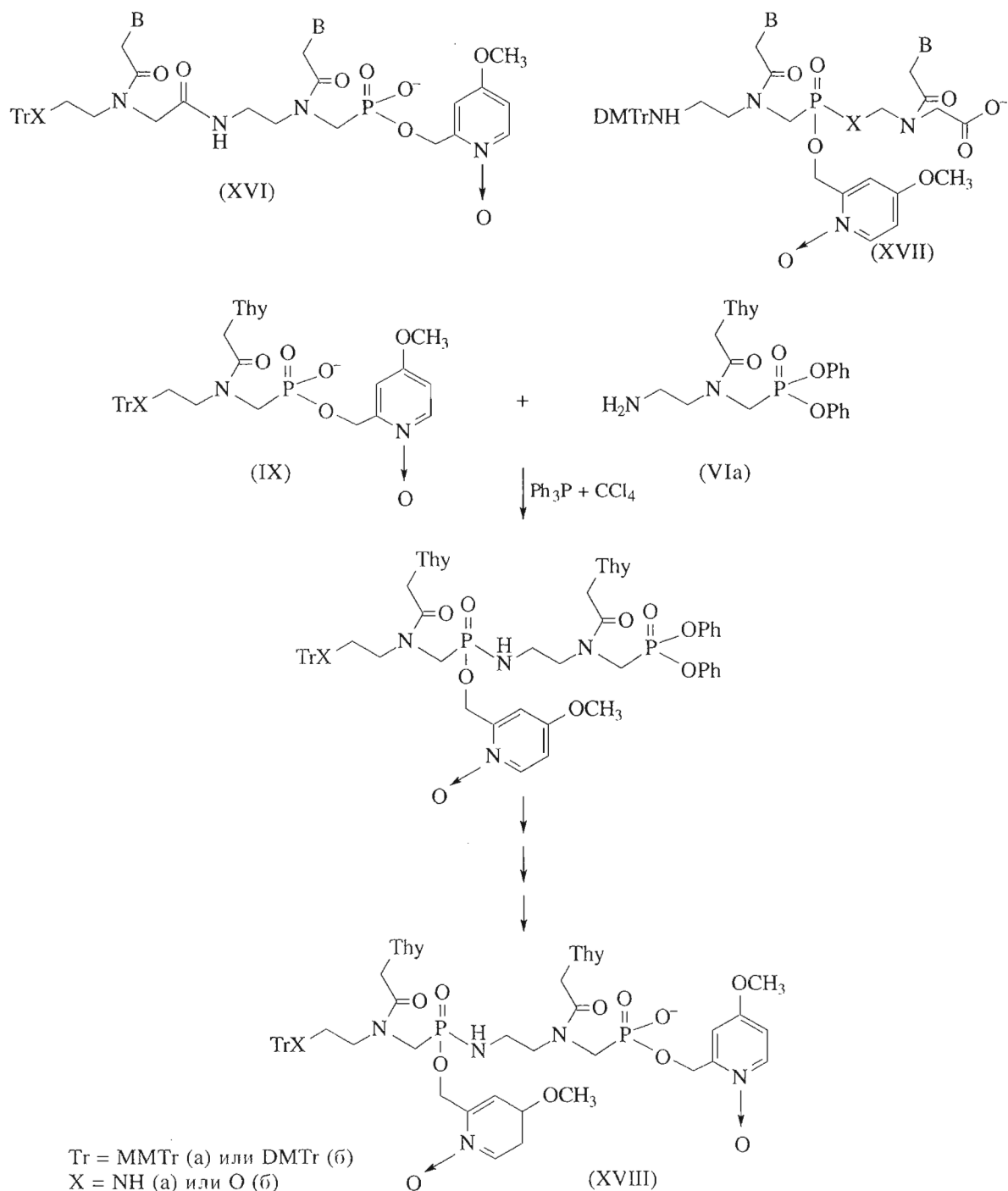


Схема 5.

фонамидной связи в данном случае использовалась смесь трифенилфосфина и четыреххлористого углерода. Хотя этот реагент работает достаточно медленно и реакция конденсации в растворе завершается за 40 мин (что делает этот реагент непригодным для твердофазного синтеза), выход продукта был практически количественным. В качестве альтернативы в данном случае может быть использован TPS-NT, который работает значительно быстрее, однако при его применении обычно протекает побочная реакция сульфонирования OH- и в особенности NH₂-компонента, что снижает выход целевого димера.

Твердофазный синтез олигомеров-миметиков из соответствующих мономеров и димеров осуществлялся на носителе на основе макропористых стеклянных шариков. На каждой стадии брали 5-кратный избыток мономерного компонента относительно первого звена, присоединенного к носителю. Реакции конденсации проводили в присутствии 3-кратного избытка конденсирующего реагента относительно находящегося в растворе мономера в течение 5–10 мин. В качестве растворителя использовали смесь ацетонитрила и пиридина. Реакцию конденсации моноэфира соответствующего фосфоната с носителем по его концевым OH- и NH₂-группам проводили в присутствии TPS-NT как конденсирующего агента. Аналогично процедуре, описанной Джорба и др. [20] для пептидного синтеза, мы использовали TPS-NT в присутствии нуклеофильного катализатора для образования амидной связи между концевой аминогруппой, присоединенной к носителю, и карбоксильной группой следующего остатка ПНК [12]. Перед каждой следующей стадией наращивания цепи диметокситритильную группу с концевой OH-группы на носителе удаляли действием раствора 3% дихлоруксусной кислоты в дихлорметане, а монометокситритильную N-защитную группу – действием 3% раствора пентафторфенола в дихлорметане. Мы обнаружили, что последний реагент достаточно силен для обеспечения быстрого удаления монометокситритильной группы с аминоконца, и в то же время практически не затрагивает фосфонамидные связи [12]. После завершения процесса наращивания цепи и удаления тритильной защитной группы с концевых гидроксильных или аминоконцов, фПНК-содержащие олигомеры деблокировали последовательной обработкой тиофенолятом триэтиламмония для удаления 4-метокси-1-оксидо-2-пиколильной фосфонатной защитной группы, а затем концентрированным водным раствором аммиака для отщепления олигомера от носителя и удаления защитных групп с гетероциклов. Олигомеры очищали и характеризовали FPLC и гель-электрофорезом в денатурирующих условиях.

Таким образом, был осуществлен синтез олигомеров, состоящих как только из однотипных мо-

номеров (ПНК, фПНК-О, фПНК-N), так и из ряда гибридных ПНК-фПНК-олигомеров. Кроме того, были получены фПНК-олигомеры смешанного типа, содержащие фосфономоноэфирные и фосфонамидные связи (фПНК-NO) (рис. 1). Один из типов полученных нами гибридов содержал чередующиеся ПНК- и фПНК-мономеры, соединенные поочередно фосфономоноэфирной (или фосфонамидной) и амидной связью (ПНК-фПНК-а). Для сборки таких гибридных молекул были использованы два подхода: первый состоял в последовательном присоединении мономеров разного типа, второй заключался в использовании гибридных димеров ПНК-фПНК в качестве синтонов при наращивании цепи. Нами также были получены химеры, состоящие из сегментов, каждый из которых был образован несколькими мономерами одного и того же типа (ПНК-фПНК-с). Для получения этих соединений была использована схема, подобная ранее опубликованной для синтеза гибридов ПНК с ДНК [6, 7]. Подобным образом также осуществлен синтез олигомеров, содержащих отдельные вкрапления фПНК-остатков в различных участках ПНК-цепи, которые составляли от 10 до 50%, а также фПНК-олигомеры и фПНК-ПНК-гибриды, имеющие на концах цепи 1–3 мономера с остатком пирена вместо гетероцикла.

Помимо этого был осуществлен синтез ряда контрольных соединений, в частности олигодезоксирибонуклеотидов, последовательность которых соответствовала последовательностям олигомеров-миметиков, а также дезоксирибо- и рибоолигонуклеотидов-матриц, комплементарных последовательностям миметиков.

ГИБРИДИЗАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ДНК-МИМЕТИКОВ

Оценка способности фПНК и их гибридов с ПНК связываться с комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот проводилась сравнением температур плавления образованных ими комплексов и температур плавления комплексов, образованных соответствующими фрагментами ДНК и ПНК. Было обнаружено некоторое увеличение стабильности комплексов между гибридами ПНК-фПНК и ДНК (РНК)-матрицами по сравнению с аналогичными комплексами, образованными фПНК. При этом олигомеры с чередующимися остатками ПНК и фПНК давали несколько более стабильные комплексы, чем гибриды, сконструированные из сегментов ПНК и фПНК. Стабильность комплексов гибридов ПНК-фПНК с комплементарными последовательностями ДНК и РНК зависела от соотношения количества мономеров каждого типа в олигомере и приближалась к стабильности комплексов ПНК с ДНК или РНК при наличии в молекуле

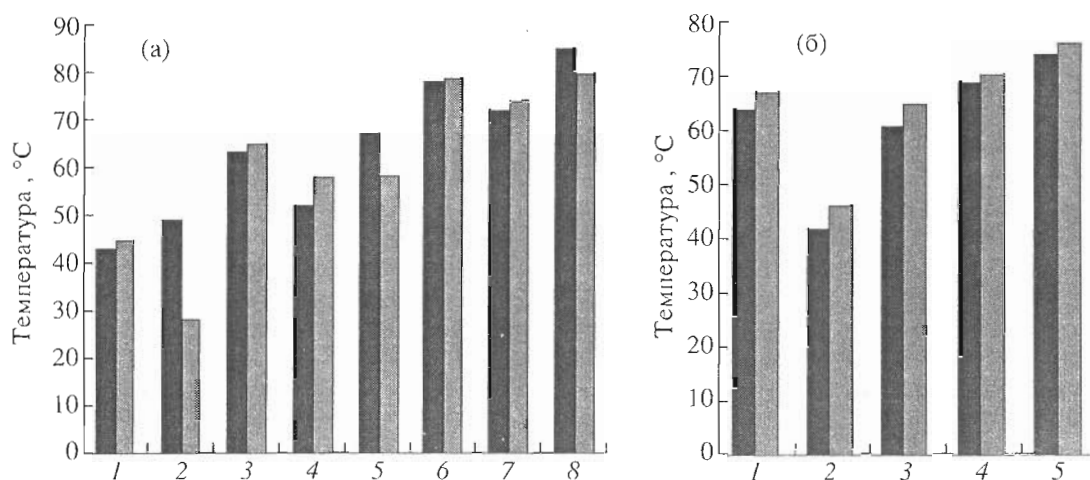


Рис. 3. Сравнение температур плавления комплексов олигодезоксирибонуклеотидов с комплементарными ДНК (черные столбики) или РНК (серые столбики) матрицами и аналогичных комплексов миметиков, содержащих различное количество ПНК- и фПНК-остатков в цепи: (а) – гомотиминовые 15-звенные олигомеры (T^*_{14} dT, где T^*_{14} состоит из dT (1), фПНК-О (2), фПНК-НО (3), ПНК-фПНК-*s* (1 : 1) (4), ПНК-фПНК-*a* (1 : 1) (5), ПНК-фПНК-*s* (6 : 1) (6), ПНК-фПНК-*s* (5 : 2) (7) и ПНК (8); (б) – олигомеры со смешанной последовательностью оснований CTGCAAAGGACACCATGA, представляющие собой ДНК (1), фПНК (2), ПНК-фПНК-*a* (1 : 1) (3), ПНК-фПНК-*s* (4.7 : 1) (4) и ПНК (5). Измерения проводились при pH 7.5.

10–20% остатков фПНК (рис. 3). Контрольные эксперименты с олигомерами, имеющими некомплементарные последовательности оснований, показали, что взаимодействие полученных нами ДНК-миметиков с НК носит сиквенс-специфический характер [12].

Титрование фрагментов ДНК и РНК миметиками, имеющими комплементарные последовательности, показало, что гомопиримидиновые олигомеры-миметики образовывали с комплементарными гомопуриновыми матрицами триплексы состава (миметик)₂/ДНК(РНК), а гомоадениновые – триплексы, в которых на одну молекулу миметика приходилось две молекулы гомопиримидиновой матрицы. По аналогии со свойствами ПНК [21] можно предположить, что образование первоначального дуплекса практически невозможно зафиксировать, так как он немедленно образует триплекс со второй молекулой фПНК или ПНК-фПНК-гибрида. В то же время олигомеры смешанного пиримидин-пуринового состава образовывали дуплексы [12]. Эти данные были подтверждены результатами анализа подвижности комплексов в полиакриламидном геле.

Изучение гибридизационной способности олигомеров, составленных из оптически активных мономеров фПНК, показало, что молекулы, построенные из хиральных остатков типа (XI), содержащих в виде боковых цепей этильные группы, по своим свойствам практически не отличаются от ахиральных фПНК. В то же время введение в боковые цепи остова фПНК гидроксильных групп вносило сильный дестабилизирующий эффект и олигомеры, составленные целиком из мономеров

типа (XII), являющихся производными серинола и имеющих гидроксильную группу в боковой цепи, не были способны образовывать достаточно прочные комплексы с комплементарными матрицами. Это выражалось в отсутствии четкого кооперативного перехода при плавлении комплексов, образованных этими соединениями с дезокси- или рибо-матрицами. Нам также не удалось зарегистрировать соответствующие комплексы с помощью гель-электрофореза.

Введение в один из концов цепи олигомера-миметика остатков пирена приводило к повышению температуры плавления его комплексов с НК на 8–12°C, причем при присоединении 2–3 пиренсодержащих мономеров наблюдалась эксимерная флуоресценция в УФ-свете как олигомера-миметика, так и комплексов, образованных им с НК.

В последнее время для оценки комплексообразования между ДНК, РНК и их аналогами достаточно широко используется электрофоретический анализ [21], вследствие своей простоты и наглядности. С помощью этого метода мы показали, что подвижность комплексов, образованных миметиками, зависит от присутствия или отсутствия $MgCl_2$ в гибридизационном буфере и от природы соответствующих матриц (ДНК или РНК). Как правило, комплексы миметиков с ДНК (или РНК) имеют меньшую электрофоретическую подвижность, чем природные дуплексы или триплексы, причем наименьшей подвижностью обладают комплексы, образуемые ПНК. В то же время одноцепочечные фПНК и фПНК-ПНК-гибриды движутся в геле медленнее, чем дезоксирибоолигонуклеотиды той же длины и состава [12]. Соот-

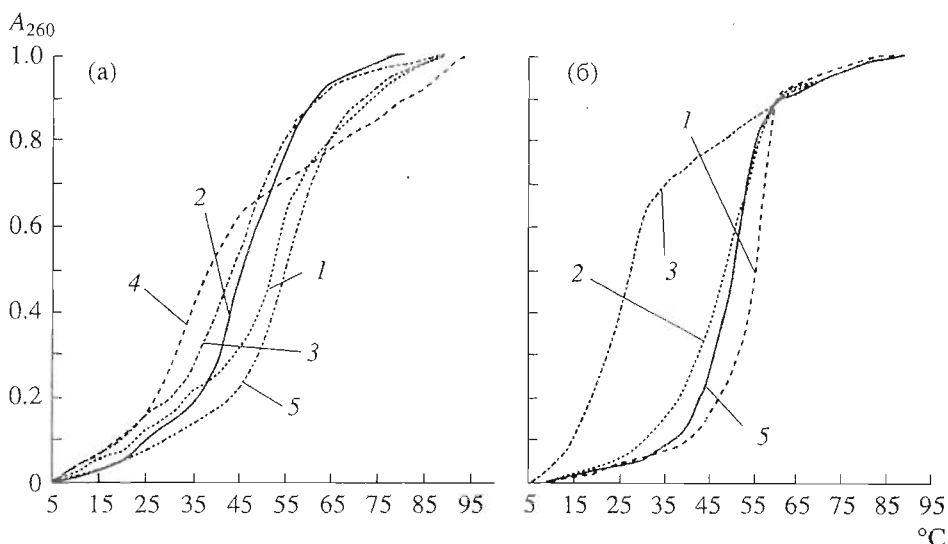


Рис. 4. Кривые плавления комплексов, образованных фПНК-олигомером (СТТТСТТТТСТСТ)*-dT (а) и дезоксирибоолигонуклеотидом d(СТТТСТТТТСТСТТ) (б) с комплементарными дезоксирибо- (1, 3, 5) и рибоолигонуклеотидами (2, 4) в антипараллельной (1, 2, 5) или параллельной (3, 4) ориентации при pH 7.5 (1-4) или 5.5 (5).

ветствующие миметикам и их комплексам с комплементарными матрицами полосы на геле могут быть легко визуализированы как в УФ-свете, так и при прокрашивании геля бромистым этидием или раствором красителя "Stains all".

Оценка влияния ориентации последовательности миметиков относительно матрицы на их гибридизационную способность проводилась нами на примере олигомеров, составленных как только из пиримидиновых мономеров, так и из олигомеров со смешанной пурин-пиримидиновой последовательностью. Полученные данные свидетельствовали, что температуры плавления комплексов, образованных миметиками с матрицами, мало зависят от их ориентации. Однако комплексы в антипараллельной ориентации были все же более тугоплавкими, чем комплексы в параллельной ориентации. В случае последовательностей, состоящих только из тимина и цитозина, протонирование последнего при pH 5.5 приводило к небольшому повышению температуры плавления комплекса миметика с НК (рис. 4).

Таким образом, нами были разработаны препаративные методы получения мономеров для автоматического твердофазного синтеза ПНК, фПНК и их гибридов. Показано, что эти химеры специфически гибридизуются с комплементарными фрагментами ДНК и РНК, причем стабильность образованных ими комплексов увеличивается пропорционально увеличению количества остатков ПНК в цепи миметика. При этом гомопиримидиновые олигомеры образуют с одноцепочечными гомопуриновыми комплементарными ДНК и РНК триплексы, в которых на две молекулы миметика приходится одна молекула

олигонуклеотида. Гомопуриновые миметики также образуют триплексы с гомопиримидиновыми олигонуклеотидами, в состав которых входит одна молекула миметика на две молекулы ДНК (или РНК). Взаимодействие миметиков с НК происходит как в антипараллельной, так и в параллельной ориентации цепей. Олигомеры со смешанными пиримидин-пуриновыми последовательностями образуют с комплементарными фрагментами НК дуплексы. Введение в конец олигомера-миметика 2-3 фПНК- или ПНК-мономеров, содержащих остаток пирена позволяет получить флуоресцентно-меченые соединения. Ввиду присущих им физико-химических характеристик гибриды ПНК и фПНК наиболее перспективны в плане возможности их использования в терапевтических целях как антисенс или антигенных реагентов из описанных в данной работе соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались органические растворители и реагенты фирмы Merck (ФРГ), (R)(-)-2-амино-1-бутанол (Fluka) и 1-пиренилукусная 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 МГц). Химические сдвиги приведены в шкале δ . ТСХ проводили на пластинках Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) в системе растворителей хлороформ-метанол, 9:1 (А), хлороформ-метанол-триэтиламин, 8.4 : 1.5 : 0.1 (Б) или бензол-этилацетат, 7 : 3 (В). Для колоночной хроматографии использовали Silica gel 60 (Merck). Автоматичес-

кий синтез олигомеров проводился на синтезаторе фирмы Applied Biosystems (Модель 381А, США). Для синтеза олигонуклеотидов использовались фосфитамидные мономеры фирмы Milligore (США). Деблокирование и выделение природных олигонуклеотидов проводили по стандартным методикам. Димеры ПНК-фПНК (XVI) и фПНК-ПНК (XVII) получали также, как описано в работе [12]. Твердофазный синтез и удаление защитных групп с олигомеров-миметиков осуществляли согласно [10, 12]. Силильную защитную группу с олигомеров, полученных из мономера (XII), удаляли, как описано в работе [22], для деблокирования рибоолигонуклеотидов.

Очистку олигомеров выполняли FPLC и/или гель-электрофорезом в основном как в работе [12]. Ионообменную хроматографию проводили на FPLC-системе фирмы Pharmacia (Швеция) в линейном градиенте NaCl (0 → 1.2 М) в 0.02 М NaOH (pH 12) на колонке Mono-Q (Pharmacia) со скоростью подачи градиента 1 мл/мин. Обратную фазовую FPLC-хроматографию осуществляли на колонке RepRPC (Pharmacia) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (10 → 30%) в 0.1 М триэтиламмонийацетате (pH 8). Электрофорез проводили в 15% ПААГ в денатурирующих условиях (7 М мочевины) в буфере 0.1 М Трис-борат/ЭДТА (pH 8.3). Полосы, соответствующие синтезированным продуктам, визуализировались в отраженном УФ-свете, вырезались из геля и элюировались 0.25 М ТЕАВ в течение 16 ч. Полученный элюат упаривался досуха, остаток растворялся в 1 мл воды и обессоливался гелевой фильтрацией на колонках PD-10 (Pharmacia) в 0.05 М ТЕАВ. После упаривания остаток растворили в воде и хранили при -20°C. Гель-электрофорез дуплексов и триплексов, образованных олигомерами, проводили в нативном 15% ПААГ, как описано ранее [12].

Кривые плавления комплексов олигомеров с соответствующими ДНК(РНК) 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 (pH 7.5) [или 10 мМ фосфат натрия (pH 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.

Синтез стандартных фПНК-мономеров (IXa,б) проводили через общее промежуточное соединение (III), представляющее собой *N*-[2-(4,4'-диметокситритил)оксиэтил]аминометилдифенилфосфонат (IIIб) или *N*-[2-(4-монометокситритил)аминоэтил]аминометилдифенилфосфонат (IIIа), в основном как описано нами ранее [9, 12]. Синтез

1-*O*-диметокситритил-2-аминоэтанола (Iб) и 1-*N*-монометокситритилэтилендиамин (Iа) проводили как описано ниже в синтезе ПНК-мономеров. Тимин-1-уксусную кислоту, *N*⁴-бензоилцитозин-1-уксусную кислоту и *N*⁶-бензоиладенин-9-уксусную кислоту получали в соответствии с [5, 18, 23]. *N*²-Изобутирилгуанин-9-уксусную кислоту синтезировали из *N*²-изобутирилгуанина, полученного как описано в работе [24], и бромуксусной кислоты по методу [18]. В отличие от ранее описанных методик на стадии присоединения *N*⁴-бензоилцитозин-1-уксусной кислоты к интермедиату (III) в качестве растворителя использовался пиридин, а синтез *N*²-изобутирилгуанин- и пиренсодержащих фПНК-мономеров проводили аналогично пиримидинсодержащим мономерам с использованием DCC для присоединения гетероциклического основания к глицин-фосфатному остову [12]. Структуры всех описанных в данной работе мономеров подтверждались ¹H и ³¹P-ЯМР-спектроскопией.

Тиминсодержащий мономер (XI). (*R*)(-)-2-Амино-1-бутанол (0.95 мл, 10 ммоль) растворяли в 25 мл пиридина и прибавляли этиловый эфир трифторуксусной кислоты (1.7 мл, 13 ммоль). Через 2 ч реакционную смесь упаривали в вакууме до масла, остаток высушивали повторным упариванием с пиридином и растворяли в 30 мл пиридина. Затем прибавляли диметокситритилхлорид (4.1 г, 12 ммоль) и через 6 ч к реакционной смеси добавляли 20 мл 2 М раствора гидроксида натрия в 50% водном метаноле. Через 3 ч прибавляли 50 мл воды и смесь экстрагировали бензолом (2 × 70 мл). Бензольные вытяжки упаривали, остаток хроматографировали на силикагеле в градиенте концентрации метанола (0 → 5%) в дихлорметане, содержащем 0.5% триэтиламина. Выход соединения (Iв) составил 64%, *R*_f 0.66 (Б). К соединению (Iв) (6.4 ммоль), растворенному в 20 мл ацетонитрила, прибавляли 30% раствор формальдегида (0.8 мл, 8 ммоль). Через 30 мин реакционную смесь упаривали досуха, остаток высушивали отгонкой с ацетонитрилом, растворяли в 25 мл бензола и прибавляли дифенилфосфит (1.7 мл, 7.5 ммоль). Реакционную смесь нагревали 15 мин при 70°C и затем упаривали в вакууме до масла, которое растворяли в смеси ацетонитрил-четырёххлористый углерод (9 : 1, 50 мл). Затем последовательно прибавляли *N*-метилморфолин (2.85 мл, 26.5 ммоль), тимин-1-уксусную кислоту (2.6 г, 14 ммоль) и трифенилфосфин (6.9 г, 26.5 ммоль). Реакцию терминировали через 40 мин добавлением 5 мл метанола и 1.5 мл триэтиламина. Выдержав 10 мин, прибавляли равный объем 0.5 М ТЕАВ и интермедиат (IVв) экстрагировали дихлорметаном (2 × 50 мл). Органические фракции упаривали, к остатку прибавляли смесь ацетонитрил-вода (9:1, 15 мл) и DBU (3.8 мл, 25 ммоль). Через 2 ч прибавляли равный объем 0.5 М ТЕАВ и монофениловый эфир (Vв) выделяли экстракцией дихлорметаном

с последующей хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации метанола (0 → 7%) в дихлорметане в присутствии 1% триэтиламина. Выход 2.77 ммоль (42%), R_f 0.45 (Б). Превращение эфира (Vв) в мономер (XI), содержащий каталитическую защитную группу, проводили как описано ранее для мономеров типа (IX) [12]. Выход 2.15 ммоль (78%), R_f 0.25 (Б). m/z 788 ($M+H$)⁺: C₄₀H₄₆N₄O₁₁P; ³¹P-ЯМР: δ 15.1 и 15.7.

Тиминсодержащий мономер (XII). Серинол (2.28 г, 25 ммоль) растворяли в 50 мл пиридина и прибавляли этиловый эфир трифторуксусной кислоты (3.4 мл, 28 ммоль). Смесь выдерживали 2 ч при комнатной температуре и упаривали до масла. После повторного упаривания с пиридином остаток растворяли в 200 мл смеси дихлорметан–пиридин (9 : 1) и при охлаждении до –10°C прибавляли диметокситритилхлорид (8.5 г, 25 ммоль) в 30 мл дихлорметана. Реакционную смесь выдерживали 10 ч при той же температуре, и реакцию заканчивали прибавлением равного объема 5% бикарбоната натрия. Органический слой отделяли и упаривали до масла. Продукт выделяли хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации этилацетата (0 → 30%) в бензоле, содержащем 0.5% триэтиламина. Выход 16.5 ммоль (66%), R_f 0.45 (В). Далее 10 ммоль *N*-трифторацетил-1-*O*-диметокситритилсеринола обрабатывали 15 мин в 30 мл ацетонитрила *трет*-бутилдиметилхлорсиланом (1.8 г, 12 ммоль) в присутствии 1-метилимидазола (2 мл, 24 ммоль). Затем прибавляли 60 мл 5% бикарбоната натрия и *O*¹-диметокситритил-*O*³-*трет*-бутилдиметилсил-*N*²-трифторацетилсеринол выделяли экстракцией бензолом (2 × 100 мл). Органическую фракцию отделяли и упаривали до масла, остаток растворяли в 80 мл 1 М раствора гидроксида натрия в смеси метанол–вода (8 : 2). По окончании реакции (3 ч) прибавляли равный объем воды. Соединение (Iг) выделяли экстракцией бензолом (2 × 150 мл) с последующей хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации этилацетата (0 → 10%) в дихлорметане, содержащем 0.5% триэтиламина. Выход составил 75%, R_f 0.34 (В). Далее 7.5 ммоль соединения (Iг) растворяли в 25 мл ацетонитрила и прибавляли 30% раствор формальдегида (0.9 мл, 9 ммоль). Через 30 мин реакционную смесь упаривали досуха, остаток высушивали повторным упариванием с ацетонитрилом и растворяли в 25 мл бензола. К раствору прибавляли дифенилфосфит (1.8 мл, 8 ммоль) и реакционную смесь нагревали 15 мин при 70°C. Бензол отгоняли в вакууме, остаток, содержащий соединение (IIIг), растворяли в 50 мл смеси ацетонитрил–четырехлористый углерод (9:1). Затем последовательно прибавляли *N*-метилморфолин (3.1 мл, 30 ммоль), тимин-1-уксусную кислоту (2.76 г, 15 ммоль) и трифенилфосфин (7.8 г, 30 ммоль). По окончании ре-

акции (40 мин) добавляли 5 мл метанола и 1.5 мл триэтиламина и через 10 мин равный объем 0.5 М ТЕАВ. Дифениловый эфир (IVг) экстрагировали дихлорметаном (2 × 150 мл). Органический слой упаривали, остаток растворяли в 30 мл 90% водного ацетонитрила и добавляли DBU (3.8 мл, 25 ммоль). Через 2 ч прибавляли 30 мл 0.5 М ТЕАВ и монофениловый эфир (Vг) выделяли экстракцией дихлорметаном с последующей хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации метанола (0 → 7%) в дихлорметане, содержащем 1% триэтиламина. Выход составил 3.22 ммоль (46%), R_f 0.55 (Б). Превращение монофенилового эфира (Vг) в производное (XII), содержащее каталитическую защитную группу, проводили как описано ранее [12]. Выход 2.4 ммоль (75%), R_f 0.34 (Б). m/z 906 ($M+H$)⁺: C₄₅H₅₇N₄O₁₂PSi; ³¹P-ЯМР: δ 15.0 и 15.5.

Синтез фПНК-фПНК-димера (XVIII) в растворе. Тиминсодержащий дифенилфосфонат (IVа) (2 ммоль) [12] обрабатывали 15 мин 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 (2 × 15 мл). Остаток растворяли в сухом пиридине (8 мл) и прибавляли тиминсодержащий мономер (IX) (1.9 ммоль) [12], растворенный в 8 мл смеси ацетонитрил–четырехлористый углерод (7 : 1), а затем трифенилфосфин (4 ммоль). Реакцию проводили 40 мин при комнатной температуре и прекращали прибавлением 3 мл метанола и 4 ммоль диизопропилэтиламина. Через 15 мин к смеси добавляли 40 мл 0.5 М ТЕАВ и полностью дифениловый эфир димера экстрагировали дихлорметаном (2 × 50 мл). Органическую фракцию упаривали досуха, остаток растворяли в 25 мл 5% водного ацетонитрила и обрабатывали DBU (0.76 мл, 5 ммоль) в течение 40 мин для удаления одной из двух фенильных защитных групп. Раствор упаривали, остаток высушивали отгонкой с толуолом (2 × 25 мл). Превращение полученного монофенилового эфира димера в соответствующий 4-метокси-1-оксидопиридин-2-метилфосфонат (XVIII) проводилось как описано нами ранее для димеров типа (XVI) [12]. Выход 1.5 ммоль (75%), R_f 0.11 (Б). m/z 1170 (XVIIIа) ($M+H$)⁺: C₅₄H₆₃N₁₀O₁₆P₂. ³¹P-ЯМР: δ 26.1 и 26.9; 15.2 и 15.7. m/z 1202 (XVIIIб) ($M+H$)⁺: C₅₅H₆₄N₉O₁₈P₂; ³¹P-ЯМР: δ 22.6 и 23.2, 15.1 и 15.7.

Получение ПНК-мономеров. А. Для получения мономеров типа (XVa) этилендиамин (3.4 мл, 50 ммоль) смешивали с DBU (3.1 мл, 20 ммоль) в 100 мл дихлорметана. Раствор охлаждали до –50–60°C и прибавляли 3.1 г (10 ммоль) монометокситритилхлорида в 40 мл дихлорметана. Через 30–40 мин к реакционной смеси при комнатной температуре прибавляли воду (100 мл), органиче-

ский слой отделяли и промывали 5% раствором NaHCO_3 (100 мл). Органическую фракцию упаривали до масла и хроматографировали на силикагеле в градиенте концентрации метанола (0 → 5%) в дихлорметане, содержащем 0.5% триэтиламина. Выделенный при этом с 95% выходом *N*-(монометокситритил)этилендиамин (9.5 ммоль) растворяли в 40 мл ацетонитрила. Затем прибавляли диизопропилэтиламин (3.4 мл, 20 ммоль) и метильный эфир бромуксусной кислоты (0.95 мл, 10 ммоль). Через 20 мин реакцию останавливали прибавлением 80 мл воды и продукт экстрагировали дихлорметаном (2 × 50 мл). Органическую фракцию промывали водой (100 мл) и 5% раствором NaHCO_3 (100 мл) и упаривали досуха. Остаток высушивали упариванием с ацетонитрилом (2 × 20 мл) и растворяли в 40 мл ацетонитрила (для тимина, аденина и гуанина) или в 50 мл пиридина (для цитозина). К раствору прибавляли соответствующую пиримидин- или пуриноксусную кислоту (11 ммоль) и конденсирующий реагент. Введение пиримидиновых оснований и гуанина осуществляли с использованием DCC, а аденина – в присутствии трифенилфосфина и четыреххлористого углерода, как описано нами для фосфонатсодержащих мономеров (IVa,б). Для удаления метильной защитной группы к раствору соединения (XIV) в 50 мл ацетонитрила прибавляли 3 мл воды и DBU (3.1 мл, 20 ммоль). Через 5 ч смесь упаривали и целевой продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации метанола (0 → 8%) в дихлорметане, содержащем 1% триэтиламина. Выход 58–70%, R_f 0.16–0.18 (Б).

Б. Для получения мономеров типа (XVб) этаноламин (2 мл, 33.1 ммоль) растворяли в 100 мл сухого пиридина, охлаждали до 0°C и по каплям прибавили этиловый эфир трифторуксусной кислоты (3.2 мл, 33.1 ммоль). Через 1 ч реакционную смесь упаривали досуха, остаток растворяли в 100 мл пиридина и прибавляли диметокситритилхлорид (11.2 г, 36.3 ммоль). Через 2 ч реакцию останавливали прибавлением метанола (300 мл). Для удаления трифторацетильной группы смесь обрабатывали 1 ч 2 М раствором гидроксида натрия (200 мл). После прибавления 200 мл воды *O*-диметокситритил-2-аминоэтанол экстрагировали толуолом (2 × 200 мл). Органическую фракцию упаривали до масла и целевой продукт выделяли хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации метанола (0 → 5%) в хлористом метиле, содержащем 0.5% триэтиламина. Выход 11.3 г (94%), R_f 0.2 (А). Превращение соединения (XIIIб) в мономер (XVб) проводили как описано выше для соединений типа (XVa). Выход 55–75%, R_f 0.18–0.2 (Б). Результаты анализа мономеров (XVa) и (XVб) масс- и ^1H -ЯМР-спектроскопией полностью подтвердили структуру целевых соединений (см. также данные в работах [5–7, 17]).

Пиреносодержащие мономеры типа (IXa,б) и (XVa,б) получали по методикам, приведенным выше для мономеров с гетероциклическими основаниями. Присоединение 1-пиренилуксусной кислоты к интермедиатам (IIIa,б) и (XIIIa,б) осуществляли с помощью DCC. Выход 60–70%. (IXa): R_f 0.45 (Б), m/z 807 ($M + H$)⁺: $\text{C}_{48}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_7\text{P}$; ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): δ 15.27 и 15.78; (IXб): R_f 0.5 (Б), m/z 838 ($M + H$)⁺ $\text{C}_{49}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$; ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): δ 15.1 и 15.8. (XVa): R_f 0.28 (Б), m/z 633 ($M + H$)⁺: $\text{C}_{42}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4$; (XVб): R_f 0.3 (Б), m/z 664 ($M + H$)⁺: $\text{C}_{43}\text{H}_{37}\text{NO}_6$.

Данная работа проводится при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 98-04-48180).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Mesmaeker A., Altmann K.-H., Waldner A., Wendeborn S. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1995. V. 5. P. 343–355.
2. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. // *Science*. 1991. V. 254. P. 1497–1500.
3. Nielsen P.E., Egholm M., Buchardt O. // *Bioconjugate Chem.* 1994. V. 5. P. 3–7.
4. Bergman F., Bannwarth W., Tam S. // *Tetrahedron Lett.* 1995. V. 36. P. 6823–6826.
5. Finn P.J., Gibson N.J., Fallon R., Hamilton A., Brown T. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 3357–3364.
6. Uhlmann E., Will D.W., Breipohl G., Langner D., Ryle A. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996. V. 35. P. 2632–2635.
7. Petersen K.H., Jensen D.K., Egholm M., Nielsen P.E., Buchardt O. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995. V. 5. P. 1119–1124.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Efimov V.A., Choob M.V., Buryakova A.A., Kalinkina A.L., Chakhmakhcheva O.G. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 566–575.
13. Peyman A., Uhlmann E., Wagner K., Augustin S., Weiser C., Will D.W., Breipohl G. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997. V. 36. P. 2809–2812.
14. Efimov V.A., Chakhmakhcheva O.G., Ovchinnikov Yu.A. // *Nucleic Acids Res.* 1985. V. 13. P. 3651–3665.
15. Efimov V., Buryakova A., Dubey I., Polushin N., Chakhmakhcheva O., Ovchinnikov Yu. // *Nucleic Acids Res.* 1986. V. 14. P. 6526–6540.
16. Uhlmann E., Pfeleiderer W. // *Helv. Chim. Acta.* 1981. V. 64. P. 1688–1703.

17. Will D.W., Breipohl G., Langner D., Knolle J., Uhlmann E. // *Tetrahedron*. 1995. V. 51. P. 12069–12082.
18. Van der Laan A.C., Meeuwenoord N.J., Kuyl-Yeheskiely E., Oosting R.S., Brands R., van Boom J.H. // *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*. 1995. V. 114. P. 295–297.
19. Stetsenko D.A., Lubyako E.N., Potapov V.K., Azhikina T.L., Sverdlov E.D. // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 3571–3574.
20. Jorba X., Albericio F., Grandas A., Bannwarth W., Giral E. // *Tetrahedron Lett.* 1990. V. 31. P. 1915–1918.
21. Jones G.D., Lesnik E.A., Owens S.R., Risen L.M., Walker R.T. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 4117–4123.
22. Sproat B., Colonna F., Mullah B., Tsou D., Andrus A., Hampel A., Vinayak R. // *Nucleosides Nucleotides*. 1995. V. 14. P. 255–273.
23. Kosynkina L., Wang W., Liang T.C. // *Tetrahedron Lett.* 1994. V. 35. P. 5173–5176.
24. Jenny T.F., Schneider K.C., Benner S.A. // *Nucleosides Nucleotides*. 1992. V. 11. P. 1257–1261.

Peptide Nucleic Acids and Their Phosphonate Analogues: Synthesis and Hybridization Properties

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*

The synthesis of a series of DNA mimics—peptide nucleic acids, phosphonate analogues of peptide nucleic acids, and their hybrids—is described. The preparative synthesis of the corresponding monomers and the solid phase automated synthesis of oligomers—mimics are developed. Modified phosphonate analogues of peptide nucleic acids, in particular chiral derivatives and those with additional hydroxyl groups in the side chains of the backbone as well as pyrene derivatives of peptide nucleic acids and their phosphonate analogues, are prepared. The ability of the resulting oligomers specifically to hybridize to DNA and RNA complementary chains is studied. It is shown that phosphonate analogues of peptide nucleic acids and their hybrids with peptide nucleic acids can form complexes with the DNA and RNA complementary strands, the stability of the complexes increasing in parallel with the increase in the number of peptide nucleic acid residues in the chain of the mimic. This property, along with good water solubility, provides the precondition for further evaluation of these compounds as antisense and antigene agents.

Key words: oligonucleotides, DNA mimics, peptide nucleic acids, phosphonate analogues, hybrids, complex formation

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