



УДК 547.963.3+577.155.2

## ХИМИЧЕСКИЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ.

### 4. АНАЛИЗ ФРАГМЕНТНОЙ СТРУКТУРЫ ХИМИЧЕСКИХ РИБОНУКЛЕАЗ НА ОСНОВЕ 1,4-ДИАЗАБИЦИКЛО[2.2.2]ОКТАНА

© 2002 г. Д. А. Коневец\*, Н. Л. Миронова\*\*, И. Э. Бекк\*\*\*, М. А. Зенкова\*,  
Г. В. Шишкин\*, В. В. Власов\*, В. Н. Сильников\*#

\* Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8;

\*\* Новосибирский государственный университет, Новосибирск;

\*\*\* Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию 14.05.2001 г. Принята к печати 21.09.2001 г.

Синтезированы искусственные рибонуклеазы серии **ABLkCm**, состоящие из липофильного алкильного радикала (Et, *n*-C<sub>14</sub>H<sub>29</sub> или C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>) **A**, а также РНК-связывающего домена **B** (бисчетвертичная соль 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана) и каталитического домена **Cm** (остаток гистамина (**C1**) или гистидина (**C3**)), соединенных линкером **Lk** (*k* – число метиленовых звеньев (1 или 3) в линкере). На примере семи соединений этой серии (**ABL1C1**, **ABL3C1**, **ABL3C3**, **AC1**, **AB**, **BL2**, **BL3C3**) проведен анализ влияния доменной структуры на каталитические свойства химических рибонуклеаз. Каталитическая активность соединений определялась в реакции гидролиза *in vitro* транскриптов тРНК<sup>Lys</sup> человека и тРНК<sup>Asp</sup> дрожжей в физиологических условиях. Показано, что только химические рибонуклеазы, включающие все фрагменты конструкции **ABLkCm**, характеризуются высокой скоростью гидролиза РНК-субстрата (90% тРНК гидролизуются за 10 ч при 37°C), причем активность соединений в значительной степени определяется наличием в конструкции длинного липофильного радикала, связанного с 1,4-диазабицикло[2.2.2]октаном, и длинного линкера, связывающего РНК-гидролизующий и РНК-связывающий фрагменты. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли гидрофобных взаимодействий в ускорении реакции гидролиза РНК.

*Ключевые слова:* искусственные рибонуклеазы; доменная структура; РНК, гидролиз.

#### ВВЕДЕНИЕ

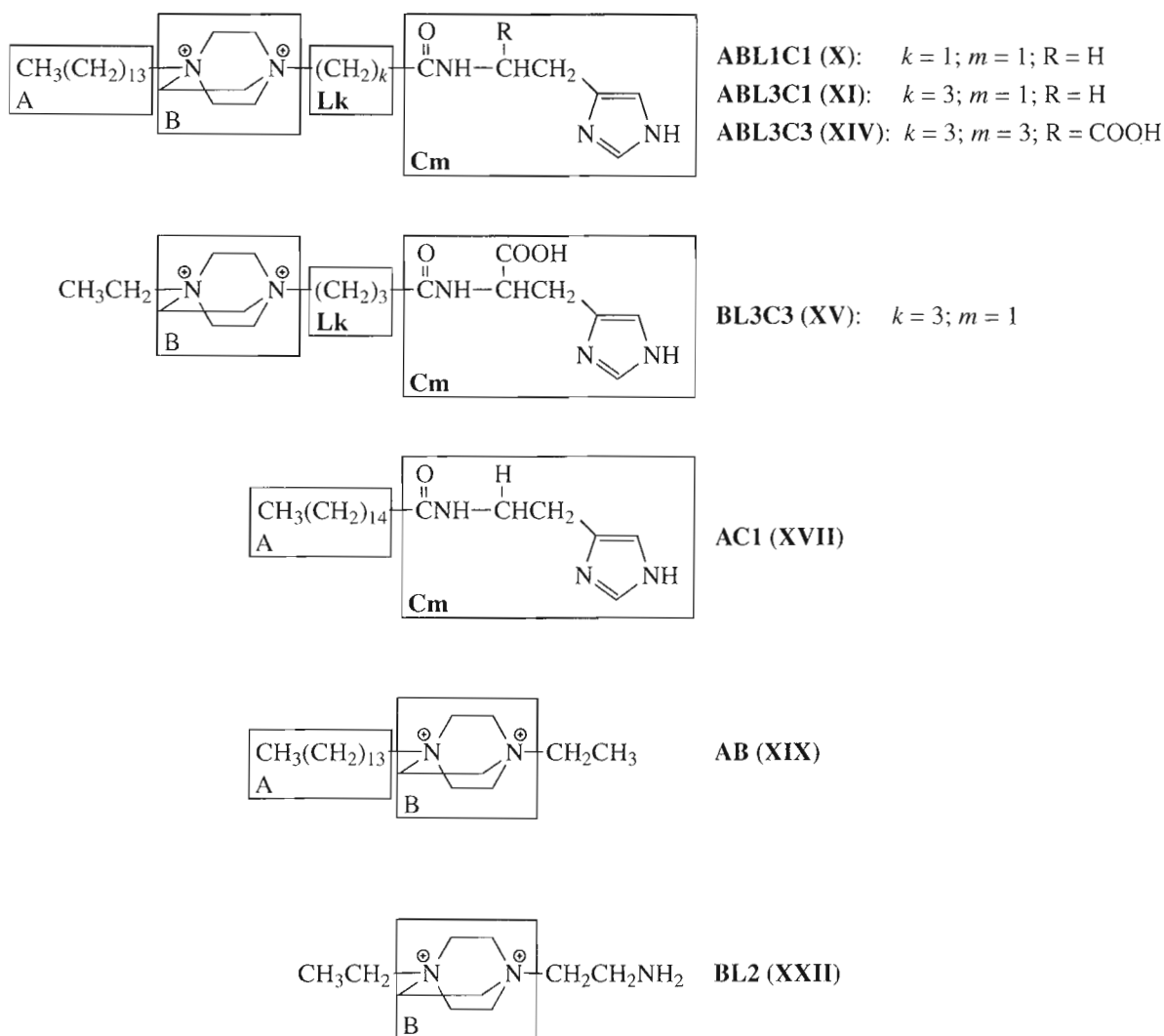
Для решения ряда фундаментальных и прикладных задач молекулярной биологии значительный интерес представляют соединения, обладающие свойством расщеплять фосфодиэфирные связи в РНК при физиологических условиях. Молекулы небольшого размера, способные неспецифически взаимодействовать с РНК и осуществлять ее гидролиз, могут быть использованы для изучения пространственной структуры РНК, а их присоединение к антисмысловым олигонуклеотидам открывает путь к созданию сайт-специфичных рибонуклеаз, которые могут стать высокоэффективными терапевтическими препаратами.

В предыдущих работах нами была продемонстрирована возможность создания эффективных катализаторов расщепления фосфодиэфирных связей в РНК путем объединения в одной молекуле как каталитически активных функциональных групп, обнаруженных в активных центрах при-

родных рибонуклеаз, так и группировок, способных электростатически связываться с нуклеиновыми кислотами [1–6]. Мы описали химические рибонуклеазы, РНК-связывающий фрагмент которых состоял из одного или нескольких остатков 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана, обладающего высоким сродством к фосфат-анионам [7], а каталитический фрагмент представлял собой остатки гистамина (**C1**), метилового эфира гистидина (**C2**) или гистидина (**C3**) [1–3]. Была исследована каталитическая активность нескольких серий химических рибонуклеаз, отличающихся числом положительных зарядов в РНК-связывающем фрагменте **B** [1, 5], структурой каталитического центра **Cm** [2, 3] и длиной связывающего их полиметиленового линкера **Lk** (готовится к печати). Было показано, что скорость гидролиза РНК значительно возрастает с увеличением числа положительных зарядов [1, 5], причем наибольшей активностью обладают соединения, содержащие в каталитическом центре остаток гистидина. Однако ни увеличение положительного заряда соединения, ни структура каталитического фрагмента

Сообщение 3 см. [1].

# Автор для переписки (факс: (3832) 33-36-77; эл. почта: silnik@niboch.nsc.ru).



**Рис. 1.** Химические рибонуклеазы и модельные соединения серии **ABLkCm**: **A** – липофильный домен, **B** – катионный РНК-связывающий домен, **L** – линкер ( $k$  – число метиленовых звеньев в линкере), **C** – каталитический домен ( $m$  – тип каталитической группы: 1 – остаток гистамина, 3 – остаток гистидина).

не влияют на позиционную направленность гидролиза РНК [2, 5, 8].

В настоящей работе путем исключения из состава молекулы искусственной рибонуклеазы **ABLkCm** (рис. 1) одного или нескольких структурных элементов мы синтезировали ряд модельных соединений, изучение каталитических свойств которых позволило определить значение каждого из доменов в химических рибонуклеазах на основе бисчетвертичных солей 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Дизайн “усеченных” искусственных рибонуклеаз

Синтезированные нами химические рибонуклеазы **ABLkCm** состоят из четырех доменов **A**, **B**,

**Cm** и **Lk** (рис. 1). Каталитический домен **Cm** содержит остаток имидазола, являющегося важной составной частью активных центров всех природных РНК-гидролизующих ферментов [9, 10]. Двухзарядный катионный домен **B**, представляющий собой бисчетвертичную соль 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана, обеспечивает электростатическое связывание искусственной рибонуклеазы с РНК. Более того, можно ожидать, что катионный фрагмент будет принимать участие в самом каталитическом акте расщепления фосфодиэфирной связи в РНК, стабилизируя отрицательно заряженный интермедиат [6]. Метиленовый или пропиленовый линкер **Lk** соединяет каталитический и РНК-связывающий домены, определяя как расстояние между ними, так и ориентацию каталитического центра относительно субстрата. Липофильный домен **A**, представляющий собой

высший нормальный углеводородный радикал, введен в структуру молекулы искусственной рибонуклеазы, чтобы облегчить ее проникновение сквозь клеточные мембраны при проведении в перспективе экспериментов по расщеплению РНК *in vivo*. Можно было предположить, что необходимым и достаточным условием проявления химической рибонуклеазой каталитической активности является наличие в структуре двух доменов – каталитического **Cm** и РНК-связывающего **B**, соединенных линкером **Lk**. Однако домен **A**, придавая химической рибонуклеазе свойства детергента, может способствовать каталитическому акту, поскольку известно, что некоторые детергенты способны самостоятельно расщеплять РНК [11].

Для выяснения роли каждого из структурных доменов нами были синтезированы модельные “усеченные” химические рибонуклеазы **BL2**, **AB**, **AC1** и **BL3C3**, состоящие из одного или нескольких фрагментов, присутствующих в базовой конструкции **ABLkCm**. В конъюгате **BL3C3** тетрадецильный заместитель базового липофильного домена **A** заменен этильным, который не обладает липофильными свойствами. Соединение **AC1**, представляющее собой гистамин, ацилированный жирной кислотой по алифатической аминогруппе, отличается от базовой конструкции **ABLkC1** отсутствием РНК-связывающего домена **B**. Соединение **AB**, бисчетвертичная соль 1,4-дiazобидциклооктана, один из алкильных заместителей которой является липофильным, отличается отсутствием каталитического домена. Соединение **BL2**, в котором нет ни каталитического домена, ни липофильного заместителя, имитирует РНК-связывающий фрагмент, причем аминогруппа, входящая в состав одного из N<sup>⊕</sup>-заместителей, эмульгирует основные свойства имидазола.

Каталитические свойства модельных соединений в реакции расщепления РНК изучались в сравнении с гидролитической активностью химических рибонуклеаз **ABL1C1**, **ABL3C1** и **ABL3C3**.

#### *Синтез и характеристика использованных в работе соединений*

При синтезе модельных соединений (схема) в основном применялись приемы и методики, разработанные нами ранее [1, 3].

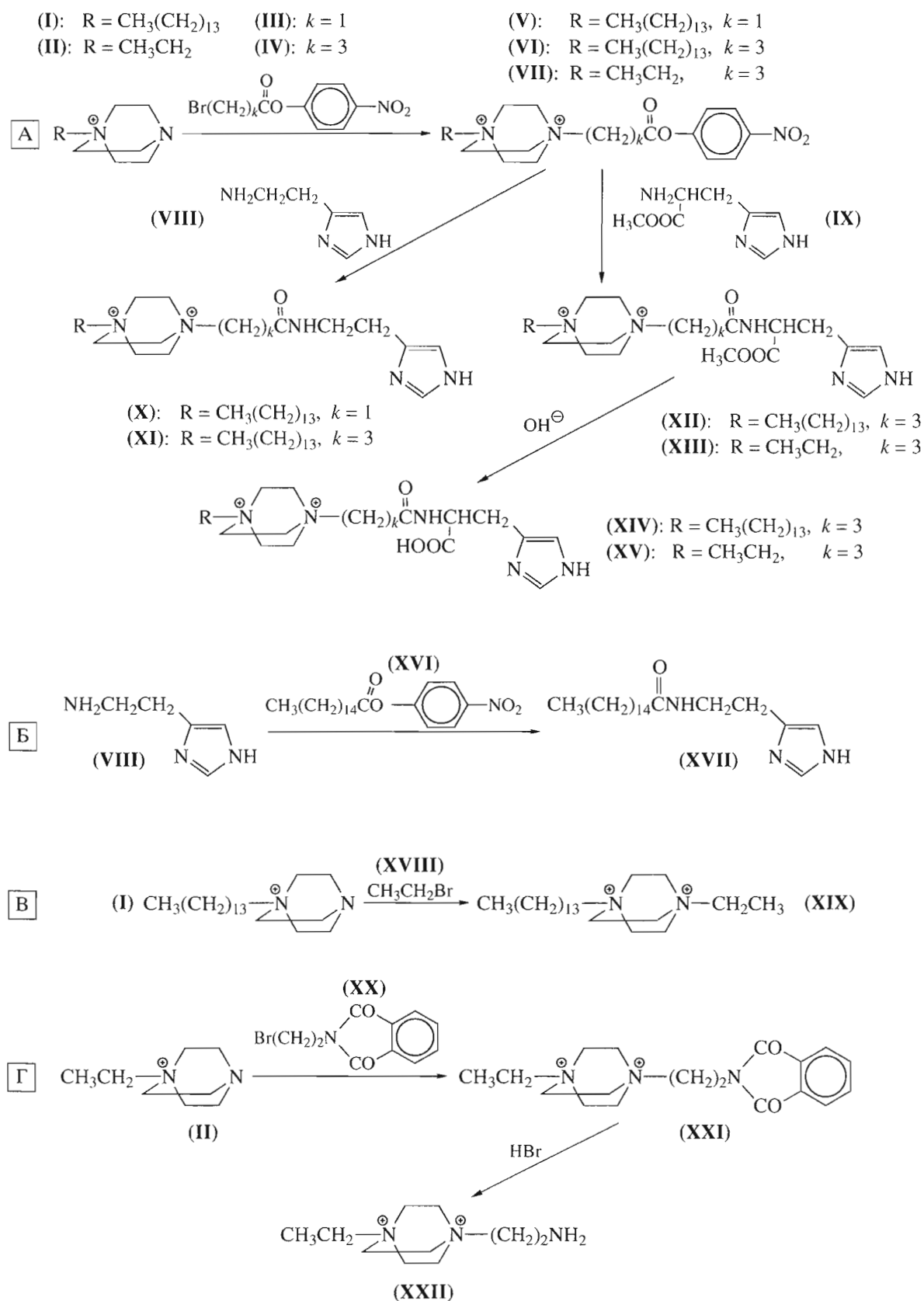
Алкилирование моночетвертичной соли 1,4-дiazобидцикло[2.2.2]октана (**I**) (см. схему А) 4-нитрофениловыми эфирами бромуксусной (**III**) и броммасляной (**IV**) кислот и алкилирование моночетвертичной соли (**II**) эфиром броммасляной кислоты (**IV**) приводило соответственно к активированным эфирам (**V**), (**VI**) и (**VII**), содержащим в своей структуре катионный РНК-связывающий фрагмент **B** и соответствующий алифатический

заместитель. Последующий аминолиз активированных эфиров (**V**) и (**VI**) гистамином (**VIII**) позволил получить целевые соединения **ABL1C1** (**X**) и **ABL3C1** (**XI**). Аналогичный аминолиз активированных эфиров (**VI**) и (**VII**) метиловым эфиром гистидина (**IX**) привел к полупродуктам (**XII**) и (**XIII**) соответственно, при омылении которых легко образовывались целевые соединения **ABL3C3** (**XIV**) [3] и **BL3C3** (**XV**) (схема А).

Неполярное липофильное производное гистамина **AC1** (**XVII**) было получено аминолизом 4-нитрофенилового эфира пальмитиновой кислоты (**XVI**) [12] (схема Б). Бисчетвертичную соль 1,4-дiazобидцикло[2.2.2]октана **AB** (**XIX**), один из алифатических заместителей которой является липофильным, получали алкилированием моночетвертичной соли (**I**) бромистым этилом (**XVIII**) (схема В). Соединение **BL2** (**XXII**) было получено алкилированием моночетвертичной соли (**II**) N-(β-бромэтил)фталимидом (**XX**) с последующим удалением защиты водным раствором HBr (схема Г).

Для доказательства строения полученных соединений использовали <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР. ИК-спектроскопия применялась для доказательства наличия в молекулах функциональных групп, которые не могут быть обнаружены с помощью <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР. Чистота и гомогенность полученных соединений были подтверждены элементным анализом и <sup>1</sup>H-ЯМР. При интерпретации ЯМР-спектров использована библиотека спектров Sadtler [13]. Анализ наложенных мультиплетов проводился путем разложения спектров на лоренцевы компоненты. ЯМР-спектры второго порядка анализировали методом эффективных ларморовых частот [14]. ИК-спектры интерпретировали на основании работы [15]. При описании ЯМР-спектров одинаковыми в пределах одного спектра верхними индексами (a,b,c...) отмечали сигналы химически подобных ядер, которые не могут быть однозначно отнесены в рамках используемого метода и, вследствие этого, эти отнесения, возможно, следует поменять местами. Индекс “псв” (псевдо) использован при описании КССВ и мультиплетности сигналов со структурой, напоминающей простые мультиплеты первого порядка, но в действительности являющихся более сложными мультиплетами второго порядка, расчет всех истинных КССВ для которых на основе полученных экспериментальных данных невозможен.

Детальное описание синтетических приемов, экспериментальных проблем и способов их решения, а также тонкостей интерпретации спектральных данных описаны в сообщении [1].

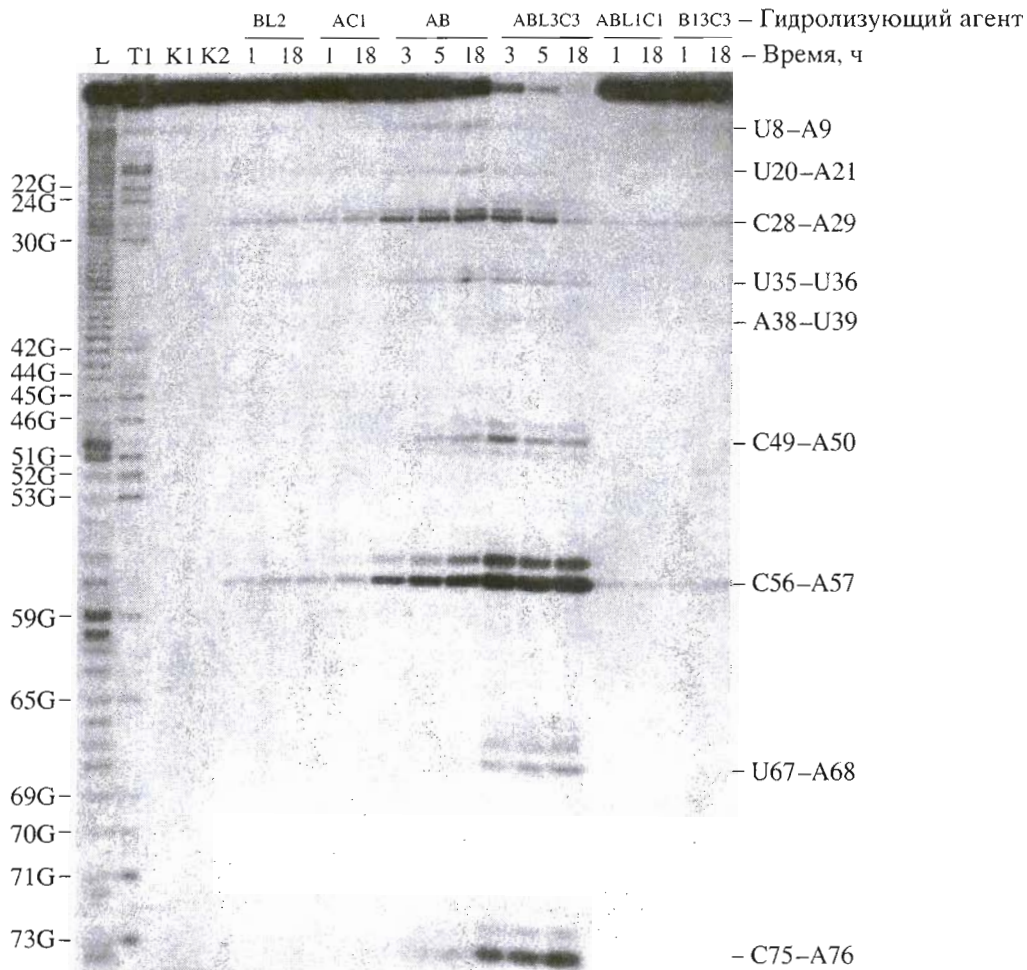


**Схема.** Синтез соединений серии ABLkCm. (А). Схема синтеза химических рибонуклеаз (А)-BLkCm (X), (XI), (XIV) и (XV). (Б). Синтез модельного соединения ACI (XVII). (В). Синтез модельного соединения АВ (XIX). (Г). Синтез модельного соединения BL2 (XXII).

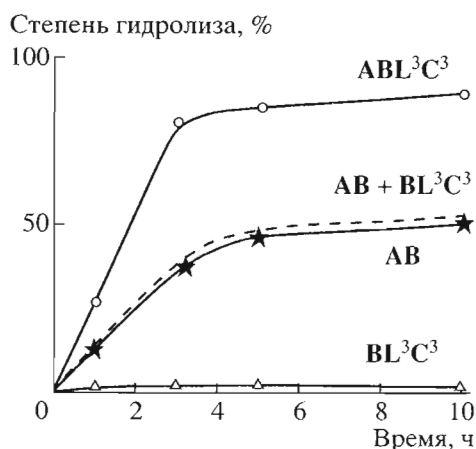
Сравнение рибонуклеазной активности модельных и базовых рибонуклеаз

Для изучения гидролитической активности синтезированных соединений в качестве субстратов были использованы *in vitro*-транскрипт дрожжевой тРНК<sup>Asp</sup> (далее тРНК<sup>Asp</sup>) и *in vitro*-транскрипт тРНК<sub>3</sub><sup>Lys</sup> человека (далее тРНК<sup>Lys</sup>), меченные <sup>32</sup>P по 5'- и 3'-концу, соответственно. Использование разных РНК позволило исключить вероятность неправильной интерпретации экспериментальных данных, связанную с возможностью специфических взаимодействий конъюгатов с уникальными фрагментами третичной структуры РНК-мишени. Меченную РНК инкубировали в присутствии синтетических рибонуклеаз или модельных конструкций либо в стандартном 50 мМ имидазольном буфере, либо в 50 мМ буфере Трис-НСl при нейтральном рН. По окончании реакции продукты гидролиза РНК-субстрата анализировали с помощью электрофореза в 12% ПААГ, содержащем 8 М мочевины. Для получения количественных данных гель анализировали на фосфоимиджере (BioImaging Analyser Fujix BAS 2000) или полосы РНК-фрагментов вырезали и определяли в них радиоактивность по Черенкову.

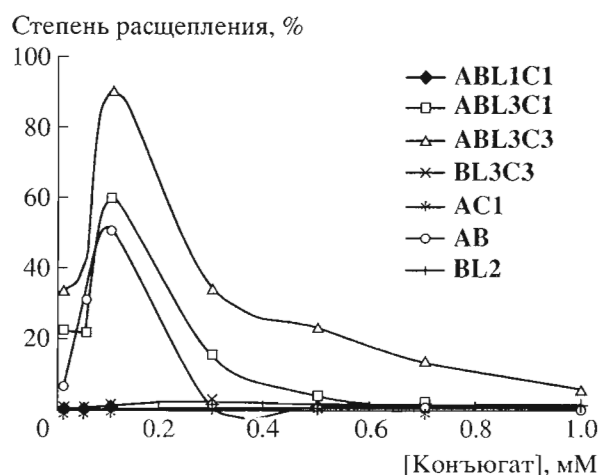
Типичный радиоавтограф геля после разделения продуктов гидролиза тРНК<sup>Lys</sup> нашими синтетическими рибонуклеазами приведен на рис. 2. Как видно из этого рисунка, не все исследованные соединения обладают РНК-гидролизующей активностью. Только соединения **ABL3C1**, **ABL3C3** и **AB** гидролизуют РНК-субстрат с заметной скоростью. тРНК<sup>Lys</sup> расщепляется при действии этих веществ не случайным образом. Основные сайты расщепления тРНК<sup>Lys</sup> – это фосфодиэфирные свя-



**Рис. 2.** Анализ продуктов гидролиза 3'-<sup>32</sup>P-меченого *in vitro*-транскрипта тРНК<sup>Lys</sup> соединениями серии **ABLkCm** в 12% полиакриламидном геле, содержащем 8 М мочевины (радиоавтограф). Дорожки L и T1 – гидролиз тРНК<sup>Lys</sup> 2 М имидазолом рН 7.0 и РНКазой T1 в денатурирующих условиях, соответственно. Дорожки K1, K2 – инкубация тРНК без добавления гидролизующих агентов (контроли) в течение 1 и 18 ч. тРНК<sup>Lys</sup> инкубировали в 50 мМ буфере Трис-НСl, рН 7.0, содержащем 0.2 М KCl, 0.1 мМ EDTA и 100 мкг/мл РНК-носитель, при 37°С в присутствии химических конструкций серии **ABLkCm** (указаны на панели сверху). Справа указаны сайты расщепления, слева – сайты гидролиза РНКазой T1.



**Рис. 3.** Кинетика гидролиза тРНК<sup>Lys</sup> химическими рибонуклеазами серии **ABLkCm** (0.1 мМ, сплошные линии). Условия реакции см. "Эксперимент. часть". Пунктирной линией показана теоретическая суммарная скорость гидролиза тРНК<sup>Lys</sup> конъюгатами **AB** и **BL3C3** при отсутствии синергического действия доменов **A** и **C**.



**Рис. 4.** Зависимость степени гидролиза *in vitro*-транскрипта тРНК<sup>Asp</sup> (10<sup>-7</sup> М) химическими рибонуклеазами серии **ABLkCm** от их концентрации. Все соединения очищены фильтрованием через центрикон Microcon-3 (см. "Эксперимент. часть").

зи U8–A9, U20–A21, C28–A29, C49–A50, C56–A57 и C75–A76. Эти же соединения проявляли рибонуклеазную активность и при использовании в качестве субстрата тРНК<sup>Asp</sup>: в ней основными сайтами расщепления являются фосфодиэфирные связи U8–A9, U13–A14, C21–A22, C41–A42 и C56–A57 (первичные данные не приводятся).

Скорости расщепления тРНК<sup>Lys</sup> разными синтетическими рибонуклеазами сильно отличаются (рис. 3) и зависят от их структуры. Как и ожидалось, наибольшую гидролитическую активность проявляли химические рибонуклеазы **ABL3C1** и

**ABL3C3**. Однако во всех случаях за 10–12 ч реакция выходила на плато. С целью корректного сравнения гидролитических активностей всех синтезированных соединений была изучена зависимость реакции гидролиза РНК от времени инкубации при их различных концентрациях.

Для корректного сравнения гидролитической активности конъюгатов были выбраны следующие условия: 0.1 мкМ тРНК-субстрат инкубировали в присутствии 0.1 мМ искусственной рибонуклеазы при 37°C в течение 10 ч в стандартном буфере, содержащем РНК-носитель (100 мкг/мл). Чтобы исключить искажения результатов эксперимента возможными примесями в растворах исследуемых соединений природных рибонуклеаз, растворы химических рибонуклеаз подвергли очистке от любых примесей с молекулярной массой более 3 кДа путем фильтрования 2 мМ растворов наших соединений в воде через мембрану центрикон Microcon-3. Известно, что РНКаза А, белок с молекулярной массой 13.7 кДа, полностью задерживается на такой мембране [16].

При исследовании зависимости степени расщепления тРНК от концентрации синтезированных веществ (рис. 4 и таблица) оказалось, что как для соединения **AB**, так и для базовых химических рибонуклеаз **ABLkCm** эта зависимость имеет колоколообразную форму с максимумом в области их концентраций 0.1–0.3 мМ. Следует отметить, что гидролитическая активность соединения **AB** проявлялась в более узком интервале концентраций. Одной из возможных причин наличия оптимума концентрации для веществ, имеющих длинный гидрофобный фрагмент, может быть их способность к мицеллообразованию. Модельные соединения **AC1**, **BL3C3** и **BL2** были малоактивны

Гидролитическая активность химических рибонуклеаз серии **ABLkCm** в отношении *in vitro*-транскрипта тРНК<sup>Asp</sup> дрожжей и *in vitro*-транскрипта тРНК<sup>Lys</sup> человека

| Конъюгат        | Гидролитическая активность*, % |                     |
|-----------------|--------------------------------|---------------------|
|                 | тРНК <sup>Asp</sup>            | тРНК <sup>Lys</sup> |
| <b>ABL1C1**</b> | 1.6                            | 0                   |
| <b>ABL3C1</b>   | 60.2                           | –                   |
| <b>ABL3C3</b>   | 91.1                           | 97                  |
| <b>BL3C3</b>    | –                              | 0.7                 |
| <b>AC1</b>      | 0.5                            | 0                   |
| <b>AB</b>       | 51.2                           | 35                  |
| <b>BL2</b>      | 1.6                            | 0                   |

\* Гидролитическую активность конъюгатов (10<sup>-4</sup> М) определяли как степень деполимеризации РНК-мишени (в %) за 10 ч при 37°C. Условия см. "Эксперимент. часть".

\*\* Растворы всех соединений были подвергнуты очистке от возможных микропримесей рибонуклеаз фильтрованием через центрикон Microcon-3 (M > 3000).

во всем диапазоне концентраций. В таблице суммированы данные по гидролитической активности синтезированных соединений по отношению к двум РНК-субстратам. Как и ожидалось, соединения **AC1** и **BL2** практически не обладают рибонуклеазной активностью. Среди веществ, содержащих отдельные фрагменты химических рибонуклеаз, только соединение **AB**, подобно базовым химическим рибонуклеазам, обладало значительной гидролитической активностью. Соединение **BL3C3**, не содержащее только липофильного фрагмента, проявляло незначительную активность при гидролизе РНК. Наши результаты показали, что изменение длины линкера в базовых химических рибонуклеазах **ABLkC1** от одного до трех метиленовых звеньев приводит к возрастанию скорости гидролиза РНК на порядок. Соединение **ABL1C1** обладало незначительной гидролитической активностью (2.6%), в то время как соединение **ABL3C1** в аналогичных условиях эффективно гидролизовало РНК (60.2%). Замена каталитического домена в искусственной рибонуклеазе **ABL3C1** с остатка гистамина на остаток гистидина (**ABL3C3**) приводила к еще большему возрастанию рибонуклеазной активности.

Соединения **ABL3C1**, **ABL3C3** и **AB**, обладающие значительной рибонуклеазной активностью, проявляли и схожую специфичность (см. рис. 2 и 5). Они гидролизовали РНК-субстрат преимущественно по СА- и UA-последовательностям, расположенным в одноцепочечных участках: основными сайтами расщепления в тРНК<sup>Lys</sup> были фосфодиэфирные связи U8–A9, U20–A21, C28–A29, C49–A50, C56–A57, C75–A76 (рис. 5); а в тРНК<sup>Asp</sup> гидролиз протекал по последовательностям U8–A9, U13–A14, C21–A22, C41–A42, C56–A57 (данные не представлены).

Анализ полученных экспериментальных данных приводит к несколько неожиданному выводу – наличию в структуре вещества **ABLkCm** липофильного домена **A**, особенно в сочетании с полярной группой, что придает ему свойства детергента, является абсолютно необходимым для эффективного протекания гидролиза РНК. В отсутствие липофильного фрагмента соединения практически не расщепляют РНК-субстрат даже при наличии всех остальных доменов в оптимальном сочетании (**BL3C3**). Согласно работе [18], наличие липофильного заместителя может приводить к ускорению гидролитического расщепления фосфодиэфирных связей за счет мицеллярного катализа. В то же время известно, что катионные детергенты, как и предложенные синтетические рибонуклеазы серии **ABLkCm**, способны самостоятельно вызывать расщепление фосфодиэфирных связей в рибонуклеиновых кислотах при концентрациях, близких к концентрациям эффективного мицеллообразования, причем проявляют выраженную специфичность к фосфодиэфирным связям в од-

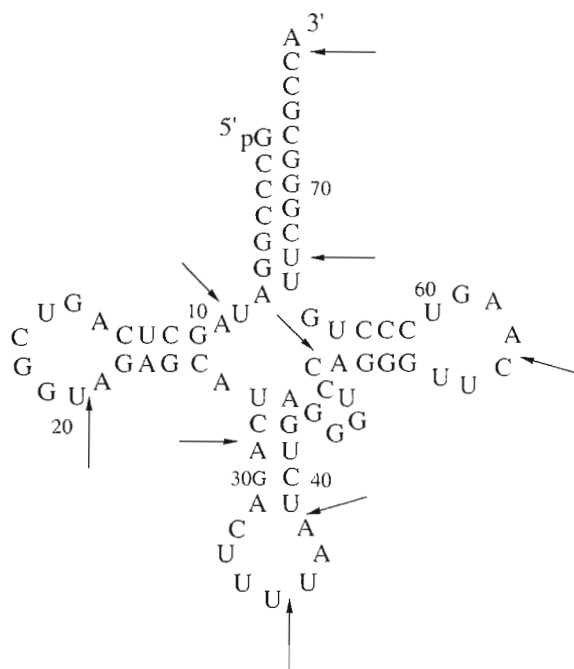


Рис. 5. Вторичная структура *in vitro*-транскрипта тРНК<sup>Lys</sup> человека [17]. Стрелками обозначены фосфодиэфирные связи, подвергающиеся гидролизу под действием химических рибонуклеаз **ABLkCm**.

ноцепочечных CpA- и UpA-последовательностях [11, 19]. Отсутствие же таких доменов химической рибонуклеазы, как каталитический (соединение **AB**) или РНК-связывающий (**AC1**), не приводит к таким радикальным последствиям, хотя эффективность гидролиза РНК в этих случаях значительно снижается. Протяженность линкера, обеспечивающего оптимальную ориентацию фрагментов относительно РНК-субстрата, также оказывала чрезвычайно сильное влияние на гидролитическую активность искусственных рибонуклеаз: короткий линкер (в **ABL1C3**) приводил к практически полной потере активности, несмотря на наличие в структуре соединения всех необходимых фрагментов. В то же время эффект от объединения в одном веществе липофильной и каталитической частей значительно превышает аддитивный: соединение **ABL3C3** более чем вдвое активнее **AB** и в десятки раз активнее **BL3C3** (рис. 3). Данный факт свидетельствует о ярко выраженном синергизме всех элементов синтетических рибонуклеаз этой серии.

Таким образом, полученные в работе данные однозначно свидетельствуют о том, что для достижения максимальной каталитической активности искусственных рибонуклеаз **ABLkCm** необходимо наличие всех доменов их молекулы: липофильного, катионного, РНК-связывающего и каталитического.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использовали следующие реактивы: *N*-(β-бромэтил)фталимид, DMSO-*d*<sub>6</sub> (Aldrich, США), гистамин, метиловый эфир *L*-гистидина и имидазол (Fluka, Швейцария), трис(гидроксиметил)аминометан, акриламид и *N,N*-метиленабисакриламид (Sigma), остальные химические реактивы – отечественного производства квалификации “х.ч.” и “ос.ч.”, очищенные, в случае необходимости, по стандартным методикам.

В работе использовали [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТР (3000 Ки/ммоль, Amersham, Англия), [<sup>32</sup>P]рСр (3000 Ки/ммоль, Биосан, Россия), РНКазу Т1 (Boehringer Mannheim, Германия), бактериальную щелочную фосфатазу (Amersham, Англия), Т4-полиинуклеотидкиназу и Т4-РНК-лигазу (Fermentas, Литва). *In vitro*-транскрипт тРНК<sup>Asp</sup> был любезно предоставлен проф. К. Флоренц (Институт молекулярной и клеточной биологии, Страсбург, Франция). *In vitro*-транскрипт тРНК<sup>Lys</sup> был получен по стандартной методике с помощью РНК-полимеразы фага Т7 как описано в работе [20].

Во всех биохимических экспериментах была использована вода, очищенная с помощью установки Milli-Q (Millipore, США). Все буферные растворы фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры с размером пор 0.22 мкм (Millipore, США). Визуализацию <sup>32</sup>P-меченой РНК в геле проводили с помощью радиоавтографии на рентгеновскую пленку Ренекс (Россия). Полиакриламидные гели анализировали с помощью системы BioImaging Analyser Fujix BAS 2000 (Fuji Photo Film Co. Ltd., Япония).

Спектры ЯМР снимали на спектрометре AM-400 (Bruker, Германия) при 400 и 100 МГц для ядер <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C соответственно. Все КССВ приведены в герцах, химические сдвиги – в миллионных долях в шкале δ. Спектры <sup>13</sup>C записаны с применением программы J-модулированного спинового эха и, в случае необходимости, без развязки от протонов. В качестве растворителя использовали DMSO-*d*<sub>6</sub> (99% D), содержащий тетраметилсилан в качестве внутреннего стандарта.

**1-Тетрадецил-4-(4-нитрофеноксикарбонил)-метил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октан, дибромид (V)** получали из 1.17 г (3 ммоль) моночетвертичной соли (I) и 1.17 г (4.5 ммоль) эфира (III) по описанной ранее методике для 1-(3-азидопропил)-4-[(4-нитрофеноксикарбонил)-метил]-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октана [1]. Светло-кремовое аморфное вещество. Выход 1.34 г (69%). <sup>1</sup>H-ЯМР: 0.85 (3H, т, *J* 6.8, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>N<sup>+</sup>); 1.24 (20H, уш. с, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 1.30 (2H, м, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>N<sup>+</sup>); 1.71 (2H, м, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 3.53 (2H, т<sub>псв</sub>, *J*<sub>псв</sub> 8.3, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 4.04<sup>a</sup> (6H, т, *J* 7.0,

CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub><sup>+</sup>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CO); 4.24<sup>a</sup> (6H, т, *J* 7.0, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub><sup>+</sup>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CO); 5.14 (2H, с, <sup>+</sup>NCH<sub>2</sub>CO); 7.62 (2H, д<sub>псв</sub>, *J*<sub>псв</sub> 9.2, H2, H6 Ph); 8.40 (2H, д<sub>псв</sub>, *J*<sub>псв</sub> 9.2, H3, H5 Ph). <sup>13</sup>C-ЯМР: 13.86 (1C, CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>N<sup>+</sup>); 21.32 (1C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 22.00 (1C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>N<sup>+</sup>); 25.45 (1C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 28.30–29.00 (8C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>); 31.20 (1C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>N<sup>+</sup>); 50.06<sup>a</sup> (3C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub><sup>+</sup>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CO); 51.80<sup>a</sup> (3C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub><sup>+</sup>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CO); 61.11<sup>b</sup> (1C, CH<sub>2</sub>, <sup>+</sup>NCH<sub>2</sub>CO); 63.60<sup>b</sup> (1C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 123.03 (2C, CH, C2, C6 Ph); 125.45 (2C, CH, C3, C5 Ph); 145.61 (1C, C, C4 Ph); 153.78 (1C, C, C1 Ph), 162.20 (1C, C, <sup>+</sup>NCH<sub>2</sub>CO).

Вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub> (649.505) (%): C 51.78, H 7.29, N 6.47. Найдено (%): C 51.83, H 6.21, N 6.17.

**1-Тетрадецил-4-[*N*-(2-имидазол-4-илэтил)карбамил]метил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октан, дибромид (X)** получали из 12 мг (0.11 ммоль) гистамина (VIII) и 65 мг (0.1 ммоль) активированного эфира (V) по методике, описанной ранее для 1-тетрадецил-4-γ-(*N*-(2-имидазол-4-ил)этил)карбамил)пропил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октана [3]. Очень гигроскопичное слабоокрашенное аморфное вещество. Выход 33 мг (53%). <sup>1</sup>H-ЯМР: 0.85 (3H, т, *J* 6.6, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>N<sup>+</sup>); 1.24 (22H, уш. с, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 1.68 (2H, уш. м, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 2.66 (2H, т, *J* 7.1, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Im); 3.38 (2H, дт, *J*<sub>д</sub> 5.0, *J*<sub>т</sub> 7.1, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Im); 3.50 (2H, т<sub>псв</sub>, *J*<sub>псв</sub> 7.8, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 3.96<sup>a</sup> (6H, т, *J* 7.8, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub><sup>+</sup>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CO); 4.12<sup>a</sup> (6H, т, *J* 7.8, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub><sup>+</sup>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CO); 4.42 (2H, с, <sup>+</sup>NCH<sub>2</sub>CONH); 6.63 (1H, с, H-5 Im); 7.53 (1H, с, H-2 Im); 8.83 (1H, т, *J* 5.0, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Im); 11.85 (1H, уш. с, H-1 Im). <sup>13</sup>C-ЯМР: 13.75 (1C, CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>N<sup>+</sup>); 21.20 (1C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 21.70 (1C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>N<sup>+</sup>); 25.41 (1C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 28.26 (1C, CH<sub>2</sub>, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Im); 28.52–28.86 (8C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>); 31.11 (1C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>N<sup>+</sup>); 38.91 (1C, CH<sub>2</sub>, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Im); 50.08<sup>a</sup> (3C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub><sup>+</sup>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CO); 51.34<sup>a</sup> (3C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub><sup>+</sup>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CO); 61.69<sup>b</sup> (1C, CH<sub>2</sub>, <sup>+</sup>NCH<sub>2</sub>CONH); 63.47<sup>b</sup> (1C, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 117.83 (1C, CH, C5 Im); 133.28



(1C, C, C4 Im); 134.55 (1C, CH, C2 Im); 161.91 (1C, C,  $\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{Im}$ ).

Вычислено для  $\text{C}_{27}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{OBr}_2$  (621.541) (%): C 52.18, H 8.27, N 11.28. Найдено (%): C 51.65, H 8.60, N 11.11.

**1-Этил-4-γ-(нитрофеноксикарбонил)пропил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октан, дибромид (VII)** получали из 1.11 г (5 ммоль) моночетвертичной соли (II) и 2.16 г (7.5 ммоль) эфира (IV) по методике, описанной ранее для 1-(3-азидопропил)-4-[(4-нитрофеноксикарбонил)метил]-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октана [1]. Светло-кремовое аморфное вещество. Выход 1.51 г (59%).  $^1\text{H}$ -ЯМР: 1.29 (3H, т,  $J$  7.1,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}^+$ ), 2.12 (2H, м,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.81 (2H, т,  $J$  6.7,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.67 (2H, к,  $J$  7.1,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}^+$ ), 3.70 (2H,  $T_{\text{псв}}, J_{\text{псв}}$  8.2,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.95<sup>a</sup> (6H,  $T_{\text{псв}}, J_{\text{псв}}$  7.5,  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CO}$ ); 4.01<sup>a</sup> (6H,  $T_{\text{псв}}, J_{\text{псв}}$  7.5,  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CO}$ ); 7.51 (2H,  $D_{\text{псв}}, J_{\text{псв}}$  9.0, H2, H6 Ph); 8.32 (2H,  $D_{\text{псв}}, J_{\text{псв}}$  9.0, H3, H5 Ph).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 7.43 (1C,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+\text{N}$ ); 16.98 (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 30.06 (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 49.87<sup>a</sup> (3C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CO}$ ); 50.40<sup>a</sup> (3C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CO}$ ); 59.16<sup>b</sup> (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}^+$ ); 62.14<sup>b</sup> (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $^+\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 123.08 (2C, CH, C2, C6 Ph); 125.15 (2C, CH, C3, C5 Ph); 144.99 (1C, C, C4 Ph); 155.07 (1C, C, C1 Ph); 169.97 (1C, C,  $^+\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CO}$ ).

Вычислено для  $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}_2$  (509.237) (%): C 42.46, H 5.34, N 8.25. Найдено (%): C 42.63, H 5.36, N 8.77.

**1-Этил-4-γ-[N-(1-метоксикарбонил-2-(имидазол-4-ил)этил)карбамил]пропил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октан, дибромид (XIII)** получали из 54 мг (0.33 ммоль) метилового эфира гистидина (IX) и 153 мг (0.3 ммоль) активированного эфира (VII) по методике, описанной ранее для 1-тетрадецил-4-γ-[N-(2-(имидазол-4-ил)этил)карбамил]пропил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октана [3]. Очень гигроскопичное слабоокрашенное аморфное вещество. Выход 85 мг (53%).  $^1\text{H}$ -ЯМР: 1.28 (3H, т,  $J$  7.1,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}^+$ ); 1.87 (2H, м,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 2.24 (2H, т,  $J$  6.5,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ); 2.97 (2H, сложный мультиплет, центр масс АВ-части спектра спиновой системы АВХ; расчет спектра позволил выявить следующие параметры системы:  $\delta_A$  2.93,  $\delta_B$  3.01,  $J_{AB}$  14.5,  $J_{AX}$  4.9,  $J_{BX}$  8.1,  $\text{CONHCH}(\text{COOCH}_3)\text{CH}_2\text{Im}$ ); 3.45 (2H,  $T_{\text{псв}}, J_{\text{псв}}$  7.8,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ); 3.60 (2H, к,  $J$  7.1,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}^+$ ); 3.63 (3H, с,  $\text{CONHCH}(\text{COOCH}_3)\text{CH}_2\text{Im}$ ); 3.91 (12H, с,  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CONH}$ ); 4.53 (1H,  $D_{\text{тпсв}}, J_{\text{дпсв}}$  4.9,  $J_{\text{тпсв}}$  7.7  $\{ (7.3 + 8.1)/2 \}$ ,  $\text{CONHCH}(\text{COOCH}_3)\text{CH}_2\text{Im}$ ); 7.09 (1H, с, H-5 Im); 8.17

(1H, с, H-2 Im); 8.66 (1H, д,  $J$  7.3,  $\text{CONHCH}(\text{COOCH}_3)\text{CH}_2\text{Im}$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 7.35 (1C,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}^+$ ); 17.57 (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ); 27.55 (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CONHCH}(\text{COOCH}_3)\text{CH}_2\text{Im}$ ); 30.88 (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ); 49.86<sup>a</sup> (3C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CONH}$ ); 50.38<sup>a</sup> (3C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CONH}$ ); 51.83 (1C,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CONHCH}(\text{COOCH}_3)\text{CH}_2\text{Im}$ ); 52.04 (1C, CH,  $\text{CONHCH}(\text{COOCH}_3)\text{CH}_2\text{Im}$ ); 59.15<sup>b</sup> (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}^+$ ); 62.67<sup>b</sup> (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $^+\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CONH}$ ); 116.83 (1C, CH, C5 Im); 131.29 (1C, C, C4 Im); 134.18 (1C, CH, C2 Im); 170.30<sup>c</sup> (1C, C,  $^+\text{NCH}_2\text{CONH}$ ); 171.47<sup>c</sup> (1C, C,  $\text{CONHCH}(\text{COOCH}_3)\text{CH}_2\text{Im}$ ).

**Триэтиламмониевую соль 1-этил-4-γ-[N-(1-карбокси-2-(имидазол-4-ил)этил)карбамил]пропил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октан, дибромид (XV)** с количественным выходом получали омылением полупродукта (XIII) по методике, описанной ранее для 1-тетрадецил-4-γ-[N-(1-карбокси-2-(имидазол-4-ил)этил)карбамил]пропил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октана [3]. Очень гигроскопичное слабоокрашенное аморфное вещество.  $^1\text{H}$ -ЯМР: 1.13 (9H, т,  $J$  7.2,  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$ ), 1.29 (3H, т,  $J$  7.1,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}^+$ ); 1.93 (2H, м,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 2.25 (2H, т,  $J$  6.7,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ); 2.89 (6H, к,  $J$  7.2,  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$ ); 2.91 (2H, сложный мультиплет, центр масс АВ-части спектра спиновой системы АВХ; расчет спектра позволил выявить следующие параметры системы:  $\delta_A$  2.84,  $\delta_B$  2.98,  $J_{AB}$  14.5,  $J_{AX}$  5.0,  $J_{BX}$  8.0,  $\text{CONHCH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{Im}$ ); 3.55 (2H,  $T_{\text{псв}}, J_{\text{псв}}$  7.5,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ); 3.63 (2H, к,  $J$  7.1,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}^+$ ); 3.95 (12H, с,  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CONH}$ ); 4.37 (1H,  $D_{\text{тпсв}}, J_{\text{дпсв}}$  5.0,  $J_{\text{тпсв}}$  7.8  $\{ (7.6 + 8.0)/2 \}$ ,  $\text{CONHCH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{Im}$ ); 6.78 (1H, с, H5 Im); 7.56 (1H, с, H2 Im); 8.21 (1H, д,  $J$  7.6,  $\text{CONHCH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{Im}$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР: 7.41 (1C,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}^+$ ); 9.07 (3C,  $\text{CH}_3$ ,  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$ ); 17.89 (1C,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ); 28.84 (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CONHCH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{Im}$ ); 31.27 (1C,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ); 45.21 (3C,  $\text{CH}_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$ ); 49.88<sup>a</sup> (3C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CONH}$ ); 50.40<sup>a</sup> (3C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CONH}$ ); 53.56 (1C, CH,  $\text{CONHCH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{Im}$ ); 59.14<sup>b</sup> (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}^+$ ); 62.66<sup>b</sup> (1C,  $\text{CH}_2$ ,  $^+\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ); 118.27 (1C, CH, C5 Im); 132.76 (1C, C, C4 Im); 134.34 (1C, CH, C2 Im); 170.20<sup>c</sup> (1C, C,  $^+\text{NCH}_2\text{CONH}$ ); 173.70<sup>c</sup> (1C, C,  $\text{CONHCH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{Im}$ ).

**N-(2-(Имидазол-4-ил)этил)пальмамид (XVII)**. Раствор 95 мг (0.25 ммоль) активированного эфира (XVI) и 56 мг (0.5 ммоль) гистамина (VIII) в 5 мл диметилформамида нагревали при 50°C в течение 48 ч. Реакционную смесь упаривали до начала кристаллизации, разбавляли 20 мл этанола и осаждали продукт, прибавляя по каплям 30 мл во-

ды. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили в вакууме над  $P_2O_5$ . Белый мелкокристаллический порошок. Выход 62 мг (75%).  $^1H$ -ЯМР: 0.85 (3H, т,  $J$  6.7,  $CH_3(CH_2)_{14}CONH$ ); 1.23 (24H, уш. с,  $CH_3(CH_2)_{12}CH_2CH_2CONH$ ); 1.46 (2H, т,  $CH_3(CH_2)_{12}CH_2CH_2CONH$ ); 2.02 (2H, т,  $J$  7.2,  $CH_3(CH_2)_{13}CH_2CONH$ ); 2.53 (2H, т,  $J$  7.7,  $CONHCH_2CH_2Im$ ); 3.23 (2H, дт,  $J_d$  5.2,  $J_t$  7.7,  $CONHCH_2CH_2Im$ ); 7.05 (1H, с, H5 Im); 7.59 (1H, с, H2 Im); 7.77 (1H, т,  $J$  5.2,  $CONHCH_2CH_2Im$ ).  $^{13}C$ -ЯМР: 13.75 (1C,  $CH_3$ ,  $CH_3(CH_2)_{14}CONH$ ); 21.91 (1C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2(CH_2)_{13}CONH$ ); 25.15 (1C,  $CH_2$ ,  $CH_3(CH_2)_{12}CH_2CH_2CONH$ ); 27.68 (1C,  $CH_2$ ,  $CONHCH_2CH_2Im$ ); 28.29–28.67 (11C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2CH_2(CH_2)_{10}CH_2CH_2CONH$ ); 31.13 (1C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2CH_2(CH_2)_{12}CONH$ ); 35.40 (1C,  $CH_2$ ,  $CH_3(CH_2)_{13}CH_2CONH$ ); 38.53 (1C,  $CH_2$ ,  $CONHCH_2CH_2Im$ ); 115.68 (1C, CH, C5 Im); 126.00 (1C, CH, C2 Im); 138.54 (1C, C, C4 Im); 171.75 (1C, C,  $CH_3(CH_2)_{14}CONH$ ).

**1-Этил-4-тетрадецил-1,4-дiazониабицикло[2.2.2]октан, дибромид (XIX).** Раствор 3.89 г (0.01 моль) моночетвертичной соли (I) и 2.18 г (0.02 моль) этилбромид (XVIII) в минимальном количестве ацетона нагревали в запаянной трубке при  $45^\circ C$  в течение 72 ч. Осадок отфильтровывали, промывали небольшим количеством холодного ацетонитрила, затем ацетоном и сушили в вакууме над  $P_2O_5$ . Белый кристаллический порошок. Выход 4.23 г (85%).  $^1H$ -ЯМР: 0.86 (3H, т,  $J$  7.0,  $CH_3(CH_2)_{13}N^+$ ); 1.25 (22H, уш. с,  $CH_3(CH_2)_{11}CH_2CH_2N^+$ ); 1.30 (3H, т,  $J$  7.1,  $CH_3CH_2N^+$ ); 1.69 (2H, м,  $CH_3(CH_2)_{11}CH_2CH_2N^+$ ); 3.59 (2H, т<sub>псв</sub>,  $J_{псв}$  7.4,  $CH_3(CH_2)_{11}CH_2CH_2N^+$ ); 3.64 (2H, к,  $J$  7.1,  $CH_3CH_2N^+$ ); 3.92 (12H, с,  $+N(CH_2CH_2)_3N^+$ ).  $^{13}C$ -ЯМР: 7.45 (1C,  $CH_3$ ,  $CH_3CH_2N^+$ ); 13.88 (1C,  $CH_3$ ,  $CH_3(CH_2)_{13}N^+$ ); 21.26 (1C,  $CH_2$ ,  $CH_3(CH_2)_{11}CH_2CH_2N^+$ ); 22.02 (1C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2(CH_2)_{12}N^+$ ); 25.48 (1C,  $CH_2$ ,  $CH_3(CH_2)_{10}CH_2CH_2CH_2N^+$ ); 28.30–29.00 (8C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2CH_2(CH_2)_8CH_2CH_2CH_2N^+$ ); 31.22 (1C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2CH_2(CH_2)_{11}N^+$ ); 49.87<sup>a</sup> (3C,  $CH_2$ ,  $CH_3(CH_2)_{13}+N(CH_2CH_2)_3N^+CH_2CH_3$ ); 50.33<sup>a</sup> (3C,  $CH_2$ ,  $CH_3(CH_2)_{13}+N(CH_2CH_2)_3N^+CH_2CH_3$ ); 59.19<sup>b</sup> (1C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2N^+$ ); 63.30<sup>b</sup> (1C,  $CH_2$ ,  $CH_3(CH_2)_{12}CH_2N^+$ ).

Вычислено для  $C_{22}H_{46}N_2Br_2$  (498.427) (%): C 53.02, H 9.30, N 5.62. Найдено (%): C 50.52, H 9.61, N 5.32.

**1-Этил-4-(2-фталимидоэтил)-1,4-дiazониабицикло[2.2.2]октан, дибромид (XXI).** 1.5 г (5 ммоль) моночетвертичной соли (II) и 1.52 г (6 ммоль) галогенида (XX) растворяли в минимальном количестве сухого ацетонитрила, и раствор нагревали при  $50^\circ C$  в течение 7 сут. Осадок отфильтровывали, промывали ацетонитрилом, затем ацетоном и сушили в вакууме над  $P_2O_5$ . Бесцветные волокни-

стые кристаллы. Выход 2.16 г (84%).  $^1H$ -ЯМР: 1.31 (3H, т,  $J$  7.2,  $CH_3CH_2N^+$ ); 3.66 (2H, к,  $J$  7.2,  $CH_3CH_2N^+$ ); 3.93<sup>a</sup> (2H, т<sub>псв</sub>,  $J_{псв}$  5.0,  $+NCH_2CH_2NPh$ ); 3.97<sup>b</sup> (6H, т<sub>псв</sub>,  $J_{псв}$  5.7,  $CH_3CH_2+N(CH_2CH_2)_3N^+$ ); 4.08<sup>b</sup> (6H, т<sub>псв</sub>,  $J_{псв}$  5.7,  $CH_3CH_2Et+N(CH_2CH_2)_3N^+$ ); 4.11<sup>a</sup> (2H, т<sub>псв</sub>,  $J_{псв}$  5.0,  $+NCH_2CH_2NPh$ ); 7.90 (4H, м, Ph).  $^{13}C$ -ЯМР: 7.46 (1C,  $CH_3$ ,  $CH_3CH_2N^+$ ); 30.66 (1C,  $CH_2$ ,  $+NCH_2CH_2NPh$ ); 49.76<sup>a</sup> (3C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2+N(CH_2CH_2)_3N^+$ ); 50.64<sup>a</sup> (3C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2+N(CH_2CH_2)_3N^+$ ); 59.49<sup>b</sup> (1C,  $CH_2$ ,  $+NCH_2CH_2NPh$ ); 60.19<sup>b</sup> (1C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2N^+$ ); 123.24 (2C, CH, C2, C5 Ph); 131.60 (2C, C, C1, C6 Ph); 134.61 (2C, CH, C3, C4 Ph); 167.40 (2C, C,  $N(CO)_2Ph$ ).

Вычислено для  $C_{18}H_{25}N_3O_2Br_2 \cdot 2H_2O$  (%): C 42.27, H 5.67, N 8.22. Найдено (%): C 42.66, H 5.65, N 8.42.

**1-Этил-4-(2-аминоэтил)-1,4-дiazониабицикло[2.2.2]октан, дибромид гидробромид (XXII)** получали из 1.1 г (2 ммоль) защищенного амина (XXI) по методике, описанной ранее для 1-(2-аминоэтил)-1-азониа-4-азабицикло[2.2.2]октана [1]. Белый мелкокристаллический порошок. Выход 0.76 г (83%).  $^1H$ -ЯМР: 1.30 (3H, т,  $J$  7.1,  $CH_3CH_2N^+$ ); 3.42 (2H, уш. м, центр масс А части спектра спиновой системы AA'BB',  $J_{AB}$  7.4,  $+NH_3CH_2CH_2N^+$ ); 3.66 (2H, к,  $J$  7.1,  $CH_3CH_2N^+$ ); 3.84 (2H, м, центр масс В части спектра спиновой системы AA'BB',  $J_{AB}$  7.4,  $+NH_3CH_2CH_2N^+$ ); 3.93<sup>a</sup> (6H, т,  $J$  6.8,  $CH_3CH_2+N(CH_2CH_2)_3N^+$ ); 4.09<sup>a</sup> (6H, т,  $J$  6.8,  $CH_3CH_2+N(CH_2CH_2)_3N^+$ ); 8.28 (3H, уш. с,  $+NH_3CH_2CH_2N^+$ ).  $^{13}C$ -ЯМР: 7.45 (1C,  $CH_3$ ,  $CH_3CH_2N^+$ ); 31.86 (1C,  $CH_2$ ,  $+NH_3CH_2CH_2N^+$ ); 49.81<sup>a</sup> (3C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2+N(CH_2CH_2)_3N^+$ ); 50.91<sup>a</sup> (3C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2+N(CH_2CH_2)_3N^+$ ); 58.94<sup>b</sup> (1C,  $CH_2$ ,  $+NH_3CH_2CH_2N^+$ ); 59.24<sup>b</sup> (1C,  $CH_2$ ,  $CH_3CH_2N^+$ ).

**Получение 5'- $^{32}P$ -меченого *in vitro*-транскрипта тРНК<sup>Asp</sup>.** Введение  $^{32}P$ -метки в 5'-конец тРНК проводили в соответствии с процедурой, описанной в работе [21]. Для дефосфорилирования 8 мкг (320 пмоль) тРНК<sup>Asp</sup> растворяли в 50 мкл 50 mM Трис-НСl, pH 8.1, содержащего 5% формамида и 0.2% SDS, инкубировали в течение 5 мин при  $60^\circ C$ , после чего помещали на лед. К реакционной смеси добавляли 1 мкл (0.6 ед. акт.) бактериальной щелочной фосфатазы и инкубировали 30 мин при  $37^\circ C$ ; реакцию останавливали экстракцией фенолом. Дефосфорилированную РНК осаждали из реакционной смеси этанолом.  $^{32}P$ -метку вводили в дефосфорилированную РНК, используя  $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$  и Т4-полинуклеотидкиназу. Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 0.1 ОЕ<sub>260</sub> дефосфорилированного *in vitro*-транскрипта тРНК<sup>Asp</sup>, 10 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы и 10 мкКи  $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$  в 50 mM Трис-НСl, pH 8.0, содержащем

10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 5 мМ дитиотреит, инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Меченую РНК выделяли с помощью электрофореза в 8% ПААГ, содержащем 8 М мочевины. РНК элюировали двумя порциями по 300 мкл 0.5 М ацетата аммония, содержащего 0.1% SDS и 1 мМ EDTA, осаждали этанолом, растворяли в воде и хранили при -20°C. Полученные таким образом препараты меченой тРНК имели удельную активность 150000–200000 мин<sup>-1</sup> пмоль<sup>-1</sup>.

**Получение 3'-<sup>32</sup>P-меченого *in vitro*-транскрипта тРНК<sup>Lys</sup>.** Введение метки по 3'-концу РНК проводили с использованием [<sup>32</sup>P]рСр и Т4-РНК-лигазы. Реакционную смесь, содержащую 0.1 ОЕ<sub>260</sub> *in vitro*-транскрипта тРНК<sup>Lys</sup>, 10 ед. акт. Т4-РНК-лигазы, 20 МБк [<sup>32</sup>P]рСр в 50 мМ NEPES-КОН, рН 7.5, содержащем 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ дитиотреит, 100 мкг/мл BSA, 0.1 мМ АТР и 10% DMSO, инкубировали при 4°C в течение 18 ч. Меченую РНК выделяли с помощью электрофореза в 8% ПААГ, содержащем 8 М мочевины. РНК элюировали двумя порциями по 300 мкл 0.5 М ацетата аммония, содержащего 0.1% SDS и 1 мМ EDTA, осаждали этанолом, растворяли в воде и хранили при -20°C в течение 1–2 недель. Полученные таким образом препараты меченой тРНК имели удельную активность 150000–200000 мин<sup>-1</sup> пмоль<sup>-1</sup>.

**Приготовление растворов искусственных рибонуклеаз.** Навески синтезированных соединений растворяли в DMSO в концентрации 50 мМ. Полученные растворы разбавляли водой до концентрации 2 мМ. Для очистки от возможных высокомолекулярных примесей 500 мкл 2 мМ раствора искусственной рибонуклеазы наносили на мембрану центрикона Microcon-3 и центрифугировали 1.5 ч при 20°C и 12000 об/мин, используя настольную центрифугу Eppendorf.

**Расщепление РНК с помощью химических рибонуклеаз.** Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 50000 имп./мин [3'-<sup>32</sup>P]тРНК<sup>Lys</sup> (50 мМ Трис-НСl, рН 7.0) или [5'-<sup>32</sup>P]тРНК<sup>Asp</sup> (50 мМ имидазольный буфер, рН 7.0, 0.2 М КСl, 0.5 мМ EDTA), химическую рибонуклеазу в концентрации 0.01–1 мМ и 0.1 мг/мл РНК-носителя, инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Реакцию останавливали прибавлением 100 мкл 2% раствора перхлората лития в ацетоне, осадок РНК отделяли центрифугированием, промывали 100 мкл ацетона и растворяли в буфере для нанесения на гель, содержащем 6 М мочевины и лидирующие красители. Продукты гидролиза анализировали с помощью электрофореза в 12% ПААГ, содержащем 8 М мочевины. Степень расщепления определялась как отношение радиоактивности в полосе исходной РНК к суммарной радиоактивности, нанесенной на дорожку в геле. Отнесение сайтов гидролиза проводили сравнением с продуктами статистического гидролиза 3'-<sup>32</sup>P-меченого транскрипта тРНК<sup>Lys</sup> и

5'-<sup>32</sup>P-меченого транскрипта тРНК<sup>Asp</sup> РНКазой Т1 и 2 М имидазолом [22].

Настоящая работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ 99-04-49538, № 00-15-97969), грантом INTAS 96-1418, грантом The WellcomeTrust 063630, грантом РАН (№ 219) по поддержке молодых ученых и грантом Минобразования РФ в области фундаментального естествознания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коневец Д.А., Бекк И.Э., Сильников В.Н., Зенкова М.А., Шишкин Г.В. // Биоорганич. химия. 2000. Т. 26. С. 852–861.
2. Коневец Д.А., Зенкова М.А., Сильников В.Н., Власов В.В. // Докл. РАН. 1998. Т. 360. С. 554–558.
3. Konevets D.A., Beck I.E., Beloglazova N.G., Sulemenkov I.V., Silnikov V.N., Zenkova M.A., Shishkin G.V., Vlassov V.V. // Tetrahedron. 1999. V. 55. P. 503–512.
4. Ждан Н.С., Кузнецова И.Л., Власов А.В., Сильников В.Н., Зенкова М.А., Власов В.В. // Биоорганич. химия. 1999. Т. 25. С. 723–732.
5. Зенкова М.А., Власов А.В., Коневец Д.А., Сильников В.Н., Жиже Р., Власов В.В. // Биоорганич. химия. 2000. Т. 26. С. 679–685.
6. Зенкова М.А., Чумакова Н.Л., Власов А.В., Комарова Н.И., Веньяминова А.Г., Власов В.В., Сильников В.Н. // Молекулярн. биол. 1998. Т. 32. С. 62–70.
7. Tabushi I., Kobuke Y., Imuta J. // Nucl. Acids Symp. Ser. 1979. V. 6. P. 175–178.
8. Zenkova M., Beloglazova N., Sil'nikov V., Vlassov V., Giege R. // Meth. Enzymol. 2001. V. 341. P. 468–490.
9. Kirby A. J. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1996. V. 35. P. 707–724.
10. Morrow J. R. // Advanced In Inorgan. Chem. 1994. V. 6. P. 42–69.
11. Riepe A., Beier H., Gross H.J. // FEBS Lett. 1999. V. 457. P. 193–199.
12. Zahn H., Schade F. // Ber. 1963. V. 96. P. 1748–1750.
13. The Sadtler Standart Spectra: Nuclear Magnetic Resonance Spectra // 1966–1988. Philadelphia, Sadtler Research Laboratory. V. 1–86. № 1M–48000M.
14. Гюнтер Х. Введение в курс спектроскопии ЯМР: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
15. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул: Пер. с англ. М.: ИИЛ, 1963.
16. Podyminogin M.A., Vlassov V.V., Giege R. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 5950–5956.
17. Isel K., Ehresmann Ch., Keith G., Ehresmann B., Marquet R. Initiation of Reverse Transcription of HIV-1: Secondary Structure of the HIV-1 RNA/tRNA<sub>3</sub><sup>Lys</sup> (Template/Primer) Complex // J. Mol. Biol. 1995. V. 274. P. 236–250.
18. Menger F.M., Persichetti R.A. // J. Org. Chem. 1987. V. 52. P. 3451–3452.

19. Hosaka H., Sakabe I., Sakamoto K., Yokoyama S., Takaku H. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 20090–20094.
20. Rudinger J., Florentz C., Giege R. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 5031–5037.
21. Perret V., Garcia A., Puglisi J.D., Grosjean H., Ebe J.-P., Florentz C., Giege R. // *Biochimie.* 1990. V. 72. P. 735–744.
22. Власов А.В., Власов В.В., Жъеже Р. // Докл. РАН. 1996. Т. 349. С. 411–413.

## Chemical Ribonucleases. 4. An Analysis of the Fragment Structure of Chemical Ribonucleases Based on 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane

D. A. Konevets\*, N. L. Mironova\*\*, I. E. Beck\*\*\*, M. A. Zenkova\*, G. V. Shishkin\*, V. V. Vlasov\*, and V. N. Sil'nikov\*\*

# Fax: (3832) 33-3677; e-mail: silnik@niboch.nsc.ru

\*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Siberian Division, pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

\*\*Novosibirsk State University, Novosibirsk

\*\*\*Boreskov Institute of Catalysis, Russian Academy of Sciences, Siberian Division, Novosibirsk

Artificial ribonucleases of the **ABLkCm** series were synthesized. They consist of a lipophilic alkyl radical (Et,  $n$ -C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>, or C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>) **A**, an "RNA-binding domain" **B** (bisquaternary salt of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane), a "catalytic domain" **Cm** [histamine (C1) or histidine (C3) residue], and a "linker" **Lk** that joins the "domains" **B** and **Cm** [here, k is the number of methylene units (one or three) in the linker]. The effect of the "domain structure" on the catalytic properties of the chemical ribonucleases was analyzed using seven compounds of this series (**ABL1C1**, **ABL3C1**, **ABL3C3**, **AC1**, **AB**, **BL2**, and **BL3C3**). The catalytic activity of the compounds was assessed in the reaction of hydrolysis of the *in vitro* transcripts of human tRNA<sup>Lys</sup> and yeast tRNA<sup>Asp</sup> under physiological conditions. It was shown that only chemical ribonucleases that involve all the fragments of the **ABLkCm** construct can hydrolyze the substrate tRNA at a high rate (90% of tRNA is hydrolyzed for 10 h at 37°C). The activity of the compounds is largely determined by the presence of a long lipophilic radical linked to 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane and a long linker, which joins the RNA-hydrolyzing and RNA-binding fragments. The results indicate an important role of hydrophobic interactions in the acceleration of the RNA hydrolysis reaction. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* artificial ribonucleases; domain structure; RNA, hydrolysis