

# Пептидно-нуклеиновые кислоты: структура, свойства, применение, стратегии и практика химического синтеза

С.И.Анцыпович

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет  
119899 Москва, Ленинские горы, факс (095)939–3181

Обобщена информация о структуре и свойствах пептидно-нуклеиновых кислот (ПНК). Приведены примеры применения олигомеров ПНК в биомолекулярных исследованиях и биотехнологии. Рассмотрены литературные данные о важнейших методах химического синтеза олигомеров ПНК, основное внимание уделено эффективности процесса конденсации. Систематизированы методы синтеза ПНК, обсуждены их преимущества и недостатки. Сформулированы рекомендации по оптимизации процесса конденсации и синтеза ПНК в целом. Библиография — 153 ссылки.

## Оглавление

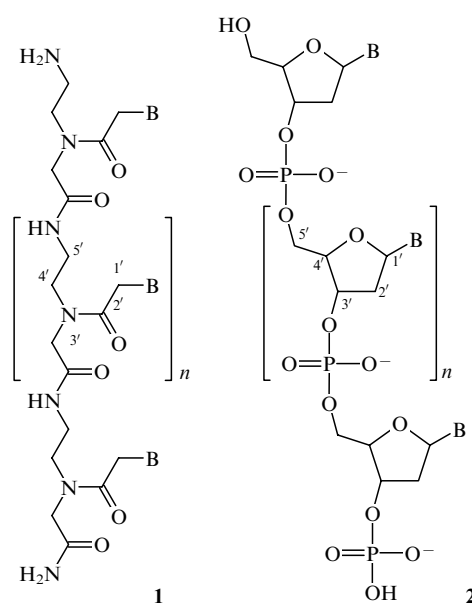
I. Введение	81
II. Свойства пептидно-нуклеиновых кислот	82
III. Применение пептидно-нуклеиновых кислот	83
IV. Основные принципы химического синтеза пептидно-нуклеиновых кислот	83
V. Факторы, влияющие на эффективность конденсации в синтезе пептидно-нуклеиновых кислот	84
VI. Особенности основных стратегий синтеза пептидно-нуклеиновых кислот	84
VII. Закономерности проведения реакции конденсации в синтезе пептидно-нуклеиновых кислот	86
VIII. Заключение	93

## I. Введение

Пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК, **1**) являются аналогами нуклеиновых кислот (НК, **2**),<sup>1–4</sup> но в отличие от НК они не содержат ни углеводных, ни фосфатных остатков и обладают незаряженным псевдопептидным остовом.<sup>1,5–8</sup> Мономерные звенья в классических ПНК состоят из остатка *N*-(2-аминоэтил)глицина и гетероциклического (пуринового или пиримидинового) основания, связанного с ним ацильным линкером. Эти мономеры соединяются между собой амидными связями, образуя полимерные цепи. Геометрия ахирального остова и его относительная гибкость<sup>3,9</sup> позволяют ПНК удивительно точно имитировать пространственную структуру углеводно-фосфатного остова НК.<sup>4</sup>

С химической точки зрения ПНК являются гибридом олигонуклеотида (из структуры которого заимствованы гетероциклические азотистые основания) и пептида (из структуры которого заимствован принцип построения остова молекул ПНК) и обладают свойствами обоих упомянутых

классов химических соединений.<sup>8,10</sup> Эта структурно-функциональная двойственность ПНК определяет их уникальные свойства.<sup>4</sup> Действительно, в этих молекулах удивительным образом сочетается способность к узнаванию, присущая структуре НК, с гибкостью и прочностью белков.



B = Ade, Gua, Thy, Cyt.

**С.И.Анцыпович.** Кандидат химических наук, научный сотрудник кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ. Телефон: (095)939–3148. E-mail: antsyrov@genebee.msu.su  
**Область научных интересов:** автоматический твердофазный синтез модифицированных фрагментов нуклеиновых кислот (олигонуклеотидов) и их аналогов, в том числе пептидно-нуклеиновых кислот (ПНК). Разработка и оптимизация новых методов синтеза модифицированных олигонуклеотидов и олигомеров ПНК.

Дата поступления 11 июля 2001 г.

Следует отметить, что название «пептидно-нуклеиновые кислоты» было выбрано с целью подчеркнуть структурную аналогию этих соединений с НК, а также отразить сходство остова олигомеров ПНК с остовом пептидов, хотя ни термин «кислота», ни термин «пептид» не применимы к ПНК, поскольку в отличие от нуклеиновых кислот ПНК не являются поликислотами, а в отличие от пептидов ПНК состоят не из аминокислот. Тем не менее аббревиатура ПНК стала общепотребительной, хотя правильнее было бы называть эти соединения полиамидными аналогами олигонуклеотидов.<sup>10</sup>

## II. Свойства пептидно-нуклеиновых кислот

Комплементарные молекулы ПНК способны формировать специфичные антипараллельные дуплексы ПНК–ПНК со спиральной структурой,<sup>4,11</sup> подобной структуре ДНК- и РНК-дуплексов, но, что еще более важно, они способны образовывать высокопрочные специфичные (антипараллельные и параллельные) дуплексы с комплементарными последовательностями ДНК и РНК,<sup>1,5–7,9,12–14</sup> содержащие уотсон-криковские пары гетероциклических оснований.<sup>2,15,16</sup> Во всех случаях антипараллельные дуплексы ПНК–ДНК обладают большей устойчивостью, чем параллельные: разница в температурах плавления составляет около 1°C на каждую пару оснований.<sup>2</sup> Спектры кругового дихроизма дуплексов ПНК–ДНК и ДНК–ДНК схожи,<sup>2,17</sup> что указывает на образование правой спирали при формировании дуплексов ПНК–ДНК, хотя геометрия пар оснований в дуплексах ПНК–ДНК и ДНК–ДНК несколько различается.<sup>17</sup> Изучение структуры дуплексов ПНК–ПНК и ПНК–ДНК методами ЯМР и рентгеновской кристаллографии показало, что дуплексы ПНК–ПНК имеют широкую и глубокую большую бороздку и узкую и мелкую малую бороздку, причем на один полный поворот спирали в дуплексе ПНК–ПНК приходится 18 пар оснований, а в дуплексе ПНК–ДНК — 13 пар оснований.<sup>17–20</sup>

Дуплексы ПНК–ПНК, ПНК–ДНК и ПНК–РНК гораздо устойчивее, чем дуплексы ДНК–ДНК, ДНК–РНК и РНК–РНК соответствующего состава.<sup>1,2,11–17,21–23</sup> Уже четырехзвенные последовательности ПНК способны давать с комплементарной ДНК дуплексы,<sup>17</sup> обладающие высокой устойчивостью. В отличие от дуплексов НК–НК, устойчивость дуплексов ПНК–НК мало зависит от ионной силы раствора.<sup>2,24–27</sup> Дуплексы ПНК–ДНК образуются быстрее, чем соответствующие дуплексы ДНК–ДНК,<sup>14,22</sup> при этом сохраняется высокая специфичность гибридизации.<sup>28</sup>

Для предсказания стабильности дуплексов ПНК–ДНК может быть использована модель, учитывающая взаимодействия только между ближайшими соседними основаниями,<sup>17,29,30</sup> однако эта модель адекватно описывает стабильность только коротких дуплексов (содержащих не более восьми звеньев).<sup>17</sup>

Важнейшим свойством ПНК является их уникальная чувствительность к наличию некомплементарных пар в структуре НК-мишени.<sup>7</sup> Разница между температурами плавления совершенного дуплекса ПНК–ДНК и несовершенного дуплекса, содержащего одну некомплементарную пару гетероциклических оснований, может достигать 20°C и более.<sup>3</sup>

Пептидно-нуклеиновые кислоты образуют с двухцепочечными ДНК триплексы состава ПНК–(ДНК)<sub>2</sub>.<sup>31–34</sup> Эти триплексы менее стабильны, чем классические триплексы (ДНК)<sub>3</sub>.<sup>34</sup> В то же время с одноцепочечными ДНК- и РНК-мишенями ПНК способны давать прочные триплексы состава (ПНК)<sub>2</sub>–ДНК и (ПНК)<sub>2</sub>–РНК соответственно.<sup>5,12,14,16,33,35–39</sup> Такие триплексы часто образуются и при взаимодействии ПНК с двухцепочечными НК.<sup>37,40–44</sup> В последнем случае при формировании триплекса происхо-

дит вытеснение одной из цепей ДНК (полное отделение либо выпетливание), и встраивание на ее место цепи ПНК.<sup>5,33,37,40–44</sup> Последняя образует с ДНК уотсон-криковские пары. Присоединение второй цепи ПНК происходит с образованием хугстиновских пар.<sup>35,39</sup> Найдено, что уотсон-криковская цепь ПНК находится в антипараллельной ориентации к цепи ДНК, а хугстиновская цепь — в параллельной.<sup>37,39</sup>

Следует отметить, что хугстиновская цепь стабилизирует первоначально образующийся уотсон-криковский дуплекс ПНК–ДНК, который может быть относительно неустойчивым.<sup>38</sup>

Наиболее склонны к триплексообразованию гомопиримидиновые молекулы ПНК, а также ПНК, богатые пиримидиновыми остатками.<sup>9,35–39</sup> Триплексы, образующиеся с их участием, чрезвычайно стабильны: десятизвенные триплексы (ПНК)<sub>2</sub>–ДНК характеризуются температурой плавления ~70°C.<sup>9,39</sup> Способность цитозинсодержащих ПНК к триплексообразованию рН-зависима, так как цитозин может образовывать хугстиновскую пару с остатком гуанина только в протонированном состоянии.<sup>9</sup> Триплексы состава (ПНК)<sub>3</sub> не обнаружены.<sup>45</sup>

Недавно появились данные<sup>37</sup> об открытии нового типа триплексов с участием ПНК. В полученном при связывании олигомера ПНК 5'-T<sub>4</sub>G<sub>2</sub>(TG)<sub>2</sub>-3' с олигонуклеотидом 5'-A<sub>4</sub>C<sub>2</sub>(AC)<sub>2</sub>-3' триплексе состава (ПНК)<sub>2</sub>–ДНК обе цепи ПНК находятся в антипараллельной ориентации по отношению к цепи ДНК.

Таким образом, потенциал ПНК по связыванию с НК далеко не исчерпан; продолжаются исследования, направленные на изучение НК-связывающих характеристик ПНК, и создаются новые образцы ПНК с усовершенствованной структурой, призванной улучшить способности ПНК к специфичному взаимодействию с комплементарными НК.<sup>37</sup>

Плавление коротких триплексов (ПНК)<sub>2</sub>–ДНК является неравновесным процессом, температура плавления зависит как от концентрации компонентов, так и от скорости нагревания.<sup>38</sup> Таким образом, стабильность комплексов (ПНК)<sub>2</sub>–ДНК носит кинетический характер.<sup>38</sup> Процесс диссоциации таких триплексов протекает в две стадии: на первой, лимитирующей стадии происходит отделение хугстиновской цепи ПНК, а на второй — быстрое отделение уотсон-криковской цепи ПНК.<sup>38</sup>

Пептидно-нуклеиновые кислоты обладают высокой химической и биологической устойчивостью.<sup>25,46</sup> Они чрезвычайно стабильны к действию клеточных нуклеаз, протеиназ и пептидаз.<sup>25,27,47</sup> Олигомеры ПНК очень медленно подвергаются ферментативному гидролизу как в клеточных экстрактах, так и *in vivo*.<sup>25,46</sup> Молекулы ПНК характеризуются низкой общей токсичностью и в целом не склонны к неспецифическому связыванию с клеточными белками. Будучи иммобилизованными на твердых поверхностях, молекулы ПНК сохраняют гибридизационные свойства, проявляемые в растворах.<sup>28</sup>

Известно, что модификация остова НК путем замены фосфодиэфирных или углеводных остатков на незаряженные или катионные структуры может придавать НК полезные свойства, например, повышать нуклеазную устойчивость, способствовать эффективному прохождению через клеточные мембраны, а также более специфичному и прочному связыванию с комплементарными НК-мишенями.<sup>48</sup> Предпринимаются также попытки усовершенствования структуры ПНК, призванные улучшить способности ПНК к неспецифическому связыванию с НК и к прохождению через клеточные мембраны.<sup>2,3,8–10,36</sup> Так, присоединение к ПНК некоторых пептидов,<sup>49–53</sup> например 16-звенного пептида «транспортана»,<sup>50,51</sup> позволяет существенно увеличить скорость проникновения молекул ПНК в клетки.<sup>9,23,49–53</sup>

Получены  $\alpha$ -спиральные ПНК ( $\alpha$ ПНК), в которых роль остова играет  $\alpha$ -спиральная пептидная структура.<sup>54–56</sup> Такие аналоги ПНК образуют высокоспецифичные прочные уотсон-криковские дуплексы с комплементарными НК<sup>54,55</sup> и отличаются очень высокой биологической стабильностью.<sup>56</sup> Синтезированы аналоги ПНК с хиральным остовом, содержащие положительно и отрицательно заряженные группы, химерные молекулы ПНК – ДНК и др.<sup>36</sup>

Сравнительное изучение аналогов ПНК самой различной структуры показало, что классические ПНК с *N*-(2-аминоэтил)глициновым остовом, впервые синтезированные Питером Нильсеном десять лет назад,<sup>1</sup> проявляют оптимальные НК-связывающие способности.<sup>4</sup> Поэтому основное внимание в данном обзоре уделено именно методам получения классических молекул ПНК, построенных на основе остатков *N*-(2-аминоэтил)глицина.<sup>1</sup>

### III. Применение пептидно-нуклеиновых кислот

Благодаря своим уникальным свойствам<sup>13,57</sup> ПНК находят широкое применение в молекулярно-биологических, биохимических, генно-инженерных и медицинских исследованиях.<sup>2,3,14,26,27,36,57–65</sup> Они являются привлекательными кандидатами на роль генетических терапевтических средств нового поколения, способных избирательно влиять на экспрессию генов.<sup>9,14,26,36,57,62–71</sup> Перспективно использование олигомеров ПНК в антисенсовой<sup>9,26,27,36,57,67,69,72–74</sup> и антигенной<sup>27,36,57,67,68,72,75,76</sup> биотехнологиях.

Антисенсовые (антисмысловые) ПНК способны избирательно ингибировать экспрессию белков мозга.<sup>47</sup> Многообещающим выглядит создание противораковых и противовирусных препаратов на основе ПНК.<sup>26,57,65</sup> Показано, что некоторые производные ПНК проявляют антибактериальную активность,<sup>36</sup> а также антисенсовую активность<sup>9,47</sup> в эукариотических клетках и в организме животных.

Показано, что ПНК способны воздействовать на все ключевые этапы генной экспрессии.<sup>9,46,57,77</sup> В наномолярных концентрациях ПНК практически полностью специфично подавляют транскрипцию ДНК-матриц.<sup>46,78</sup> Перспективность использования олигомеров ПНК в ген-ориентированных технологиях продемонстрирована на примере ПНК-зависимого ареста элонгации транскрипции РНК-полимеразами.<sup>27,46,67,68,72</sup> Олигомеры ПНК являются потенциальными ингибиторами клеточного роста благодаря своей способности эффективно блокировать транскрипцию, что может быть использовано при создании противоопухолевых медицинских препаратов.<sup>78</sup>

Дуплексы и особенно триплексы ПНК с матричной РНК (мРНК) состава ПНК – РНК и (ПНК)<sub>2</sub> – РНК способны эффективно ингибировать трансляцию мРНК.<sup>67,73,74</sup> Мощный антисенсовый эффект *in vitro* обусловлен высокой специфичностью и стабильностью триплексных структур (ПНК)<sub>2</sub> – РНК. Арест элонгации трансляции мРНК происходит уже при добавлении шестизвенной комплементарной гомопиримидиновой ПНК.<sup>73</sup>

Антисенсовая эффективность дуплексообразующих ПНК ниже, чем триплексообразующих: в этом случае для ингибирования элонгации трансляции мРНК нужны уже не менее чем 20-звенные ПНК (в то же время инициация трансляции может быть прекращена за счет образования даже короткого дуплекса ПНК – РНК).<sup>73,74</sup> Тем не менее молекулы РНК в составе гибридных дуплексов ПНК – РНК не расщепляются РНКазой Н.<sup>67,73,79–81</sup> Антисенсовый эффект дуплексообразующих ПНК обусловлен прежде всего стерическими препятствиями, возникающими при образовании прочных комплексов ПНК – РНК,<sup>9</sup> которые затрудняют трансляцию

мРНК. Не исключен также вариант ПНК-направляемой деградации мРНК, не связанный с действием РНКазы Н.<sup>9</sup>

Дуплексообразующие ПНК способны ингибировать трансляцию *in vitro*, будучи нацелены на участок связывания рибосомы, тогда как триплексообразующие ПНК могут быть нацелены на полипуриновые участки, расположенные «ниже» точки инициации трансляции.<sup>9</sup>

Пептидно-нуклеиновые кислоты могут применяться в молекулярно-биологических исследованиях для картирования молекул РНК, в том числе для выявления в структуре РНК доменов, ответственных за связывание с другими РНК и пептидами.<sup>80</sup> Их использование открывает путь к новым методам изучения РНК – РНК и РНК-белковых взаимодействий, а также процессов (например, сплайсинга) с участием нетранслируемых молекул РНК. Появились результаты, свидетельствующие о перспективности применения молекул ПНК в качестве эффективных «ловушек» ДНК-связывающих белков.<sup>81</sup> Химерные молекулы ПНК – ДНК являются удобными праймерами для ДНК-полимераз.<sup>82</sup> В последние годы ПНК все чаще применяют в качестве биомолекулярных инструментов для изучения внутриклеточных процессов.<sup>2,3,8,10,27,57,61–64,80–82</sup>

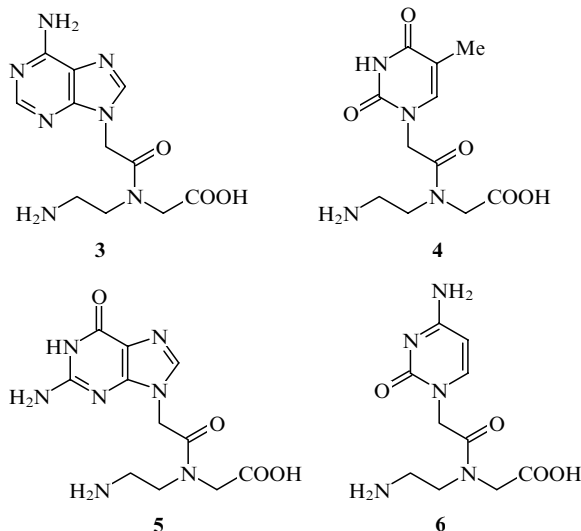
Перспективно использование ПНК для создания эффективных методов детекции процесса гибридизации, высокочувствительных к наличию некомплементарных пар в составе НК-мишени.<sup>28,83</sup> Флуоресцентно-меченные ПНК применяются в качестве диагностических зондов на определенных НК-последовательности, а также для изучения процессов прохождения олигомеров ПНК через клеточные мембраны и их внутриклеточного распределения.<sup>84–87</sup> Использование ПНК в сочетании с ионообменной ВЭЖХ (предел обнаружения — 150 пмоль),<sup>88</sup> MALDI TOF масс-спектрометрией,<sup>89</sup> капиллярным электрофорезом<sup>90</sup> и другими современными методами анализа<sup>88</sup> позволяет определять специфические генетические последовательности в образцах.

Пептидно-нуклеиновые кислоты применяются для конструирования электрохимических биосенсоров,<sup>28,91–93</sup> что открывает возможности для быстрого скрининга первичной структуры НК, а также для решения многих других задач современной биотехнологии.<sup>2–4,8,10,61</sup> Они являются замечательным материалом для конструирования диагностических инструментов нового поколения — биочипов.<sup>83</sup>

В этой связи становятся чрезвычайно актуальными разработка и оптимизация универсальных методов получения олигомеров ПНК. Ключевой стадией синтеза ПНК является конденсация мономера и олигомера ПНК под действием активирующего реагента с образованием амидной связи. Набор защитных групп и соответственно условия деблокирования, а также условия кепирования и постсинтетических обработок синтезированного олигомера ПНК во многом определяются тем, какой метод выбран для проведения конденсации.

### IV. Основные принципы химического синтеза пептидно-нуклеиновых кислот

Фактически химический синтез молекул ПНК представляет собой олигомеризацию мономеров 3–6, которые состоят из *N*-(2-аминоэтил)глицинового остова и остатка уксусной кислоты (ацетильного линкера), содержащего в качестве заместителя одно из четырех гетероциклических азотистых оснований.<sup>14</sup> В настоящее время в распоряжении исследователей имеется большой арсенал методов химического синтеза ПНК, наиболее эффективные из них получили широкое распространение в последние годы.<sup>14,94–97</sup>



Прежде всего для получения ПНК используются твердофазные методы синтеза. Стратегия синтеза олигомерных молекул на поверхности полимерного носителя была впервые разработана в 1962 г. Меррифилдом для синтеза пептидов и белков. Удивительно простая идея закрепления растущей олигомерной цепи на твердом носителе вывела синтез биоолигомеров на качественно новый уровень. В настоящее время принцип, предложенный Меррифилдом,<sup>98</sup> широко используется как в синтезе пептидов и белков, так и в синтезе фрагментов ДНК и РНК (олигонуклеотидов). В подавляющем большинстве случаев олигомеры ПНК также получают на твердом полимерном носителе. В настоящем обзоре основное внимание уделено рассмотрению вопросов, связанных с эффективностью твердофазного синтеза ПНК.

Для синтеза олигомеров ПНК можно использовать классические методы получения пептидов,<sup>14</sup> однако, учитывая особенности химической структуры мономеров ПНК, лучше применять специально разработанные для этой цели методы конденсации. Среди многих способов активации карбоксильной группы (использование активированных сложных эфиров, симметричных ангидридов, галогенангидридов, а также реагентов, активирующих *in situ*) наиболее перспективным оказался метод активации *in situ*, который применяется сегодня наиболее часто.

Данный метод предусматривает применение реагентов на основе ураниевых и фосфониевых солей, способных активировать карбоксильную группу мономера ПНК за несколько секунд. Высокая скорость активации позволяет смешивать мономер ПНК с активирующим реагентом прямо в реакционной колонке с полимерным носителем, несущим растущую олигомерную цепь (собственно активация *in situ*), или непосредственно перед добавлением мономера в реакционную колонку. Это дает возможность автоматизировать процесс синтеза ПНК.

Ниже будет подробно рассмотрен твердофазный метод получения ПНК с использованием активации *in situ*, преимущества которого доказаны на практике. Данные об эффективности применения других методов активации также могут быть полезны, поэтому им тоже будет уделено внимание.

## V. Факторы, влияющие на эффективность конденсации в синтезе пептидно-нуклеиновых кислот

Выход продукта конденсации в синтезе ПНК, образовавшийся при конденсации с использованием активации *in situ*, существенно зависит от ряда факторов. Наиболее важными из них являются следующие:

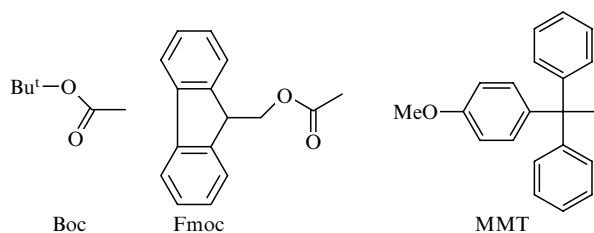
- природа и концентрация активирующего реагента;
- природа и концентрация мономера ПНК;
- природа гетероциклического основания, входящего в состав мономера ПНК, а также природа гетероциклического основания, включенного в состав олигомера ПНК в процессе предыдущего цикла синтеза;
- природа и концентрация основания (как правило, в качестве оснований в синтезе ПНК используются третичные амины);
- природа используемого растворителя (растворителей);
- присутствие или отсутствие катализаторов;
- используемая методика (предварительная активация мономера ПНК или же смешение мономера ПНК и конденсирующего реагента *in situ*);
- условия проведения процесса конденсации, такие как время и температура реакции;
- другие условия, такие как качество реактивов, степень высушивания растворителей, уровень инертности атмосферы реакции и т.д.

Следует отметить, что информация о зависимости выхода продукта конденсации от природы гетероциклических оснований мономеров ПНК практически отсутствует. Этот вопрос требует специального изучения. В большинстве литературных источников приводятся данные о средних выходах продуктов конденсации ПНК в расчете на один цикл присоединения гипотетического мономерного звена (независимо от природы мономера) или же данные об общем выходе олигомера ПНК.

Представляется оправданным уделить внимание всем перечисленным выше факторам. При этом целесообразно подробно обсудить основные аспекты, связанные с эффективностью конденсации ПНК, оставаясь в рамках тех или иных реальных условий получения ПНК, т.е. в рамках той или иной стратегии синтеза.

## VI. Особенности основных стратегий синтеза пептидно-нуклеиновых кислот

В целом синтез ПНК основывается на стандартных принципах твердофазного пептидного синтеза.<sup>14</sup> В настоящее время наиболее широко применяются три синтетические стратегии, позволяющие получать ПНК с высокими выходами и высокой степенью чистоты. Они различаются природой защитной группы, используемой для блокирования 5'-концевой первичной алифатической аминогруппы мономеров ПНК. В качестве защитных групп применяют *трет*-бутоксикарбонильную (*t*Boc или Boc), 9-флуоренилметоксикарбонильную (Fmoc), а также 4-метоксифенилдиметилметильную (монометокситритильную, ММТ) группы. Соответственно различают Boc-,<sup>12, 94, 99, 100</sup> Fmoc-,<sup>77, 97, 101–106</sup> и ММТ-стратегии<sup>96, 107–112</sup> синтеза ПНК.



Химическая природа перечисленных выше защитных групп и различия в условиях их удаления диктуют для каждой из стратегий выбор оптимальных конденсирующих реагентов и условий проведения конденсации, хотя принцип синтеза ПНК остается неизменным.

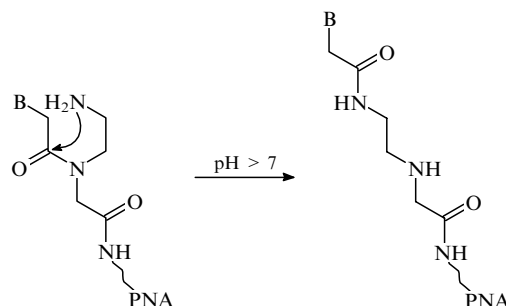
Первой для синтеза ПНК была применена Вос-стратегия.<sup>12, 94, 99, 100</sup> В этом методе для защиты экзоциклических аминогрупп гетероциклических оснований обычно используют бензилоксикарбонильную (Z, Cbz) группу (Вос/Z-модификация),<sup>94</sup> а в случае гуанина иногда дополнительно применяют *O*-бензильную защитную группу.<sup>113</sup> Описана также Вос/acyl-модификация Вос-стратегии, когда для защиты экзоциклических аминогрупп оснований используют ацильные защитные группы.<sup>95</sup> Одним из признанных недостатков Вос-стратегии является необходимость применения довольно сильных кислот для удаления Вос-группы (трифторуксусной кислоты) и для отщепления олигомера ПНК от полимерного носителя (фтористоводородной кислоты, трифторметансульфокислоты). Такие жесткие условия ограничивают круг ПНК, получаемых с использованием Вос-стратегии.

Поиск более мягких условий привел к появлению Fmoc-стратегии синтеза ПНК.<sup>14, 77, 96, 97, 101–106, 114</sup> В этой стратегии для удаления Fmoc-группы обычно применяют мягкую обработку пиперидином.<sup>14</sup> Для защиты аминогрупп гетероциклических оснований используют бензилоксикарбонильную (Z),<sup>97</sup> бензгидрилоксикарбонильную (Bhoc)<sup>106</sup> или MMT-группы.<sup>12, 96, 114</sup> Перспективна также Fmoc/acyl-модификация этой стратегии,<sup>77, 102–105</sup> в условиях которой происходит избирательное удаление Fmoc-группы при сохранении ацильных защит гетероциклических оснований.<sup>102, 103</sup> При использовании Fmoc/acyl-стратегии выходы ПНК выше, чем при использовании Fmoc/Z-стратегии, а условия проведения синтеза ПНК совместимы с условиями пептидного и олигонуклеотидного синтезов,<sup>104, 115</sup> что открывает возможности для получения гибридных ПНК – ДНК и ПНК-пептидных молекул.

Помимо Вос- и Fmoc-групп для защиты 5'-концевой первичной аминогруппы было предложено использовать MMT-группу.<sup>96, 107–112, 116</sup> И хотя MMT-группа, как и Вос-группа, является кислотолабильной, она отщепляется в существенно более мягких условиях, чем Вос-группа (для удаления MMT-группы применяют 3%-ную трихлоруксусную кислоту).<sup>107</sup> Для защиты аминогрупп гетероциклических оснований, входящих в состав мономеров, в MMT-стратегии обычно используют группы ацильного типа: ацетильную, изобутирильную, анизоильную, бензоильную и *трет*-бутилбензоильную (MMT/acyl-модификация MMT-стратегии).<sup>96, 107, 110, 116</sup> При этом условия синтеза становятся настолько мягкими, что появляется возможность получать олигомеры ПНК на автоматических олигонуклеотидных синтезаторах, а благодаря совместимости условий синтеза ПНК с условиями синтеза олигонуклеотидов — получать химерные молекулы ПНК – ДНК.<sup>107–109</sup>

Для эффективного протекания конденсации 5'-концевая аминогруппа не должна быть протонирована, так как в виде катиона  $\text{NH}_3^+$  она не обладает нуклеофильными свойствами. Однако в щелочных условиях, когда аминогруппа не прото-

нирована и, следовательно, активна, возможен нежелательный перенос *N*-концевого ацетильного остатка вместе с гетероциклическим основанием на 5'-концевую первичную алифатическую аминогруппу.<sup>94, 97, 115, 117</sup>

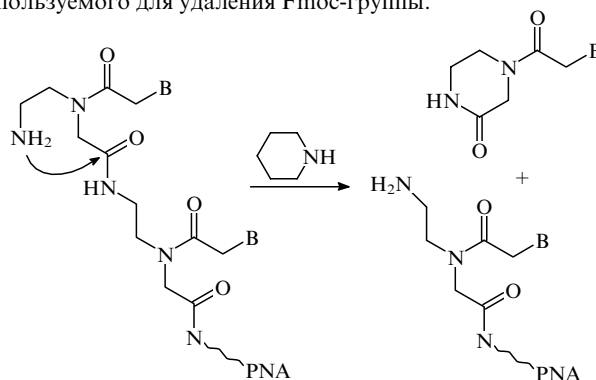


PNA — C-концевой фрагмент олигомера ПНК.

Этот процесс может протекать и в нейтральных условиях.<sup>94</sup> В результате происходит обрыв растущих цепей ПНК и накопление укороченных олигомеров. Образуется смесь продуктов, выделить из которой целевую ПНК довольно сложно.

Чтобы избежать формирования изомерных структур необходимо создать условия для быстрого протекания конденсации, тогда побочные продукты не успевают образоваться, поскольку реакция *N*-ацильного переноса — довольно медленный процесс.<sup>94, 97, 100, 117</sup> Этого удалось добиться, используя реагенты на основе ураниевых и фосфониевых солей, под действием которых конденсация протекает настолько быстро, что возможна даже активация карбоксильной группы мономера ПНК *in situ*.

Другой побочной реакцией является отщепление *N*-концевого мономерного звена<sup>12</sup> под действием пиперидина, используемого для удаления Fmoc-группы.



Следует подчеркнуть, что проблема побочных реакций, как и эффективность синтеза ПНК в целом, тесно связана с выбором комбинации защитных групп. Действительно, одно из основных различий между Вос- и Fmoc-стратегиями связано с условиями удаления защиты с 5'-аминогруппы последнего присоединенного мономера. Как отмечалось выше, для удаления Вос-группы требуется довольно жесткая кислотная обработка, которая приводит к протонированию 5'-аминогруппы. Поэтому перед присоединением очередного мономерного звена эту группу необходимо нейтрализовать, чего не требуется в случае Fmoc-стратегии.

В то же время удаление Вос-группы всегда происходит количественно и довольно быстро, тогда как Fmoc-группа под действием оснований отщепляется медленно и часто не полностью,<sup>118, 119</sup> что негативно отражается на эффективности конденсации в случае Fmoc-стратегии.

Другим препятствием эффективному протеканию реакции конденсации служит агрегация растущих олигомерных цепей. Межцепочечная агрегация приводит к тому, что деблокированная концевая аминогруппа оказывается лишь

частично доступной для последующей конденсации, это снижает эффективность процесса в целом.<sup>120, 121</sup> Следует отметить, что агрегация возможна лишь в случае непротонированных аминокетильных олигомеров.<sup>120, 121</sup> По-видимому, это связано с тем, что положительно заряженные аминокетильные группы отталкиваются друг от друга, препятствуя агрегации олигомеров. Поэтому в кислой среде межцепочечная агрегация не наблюдается и концевые аминокетильные группы более доступны для участия в конденсации. Однако в этих условиях аминокетильная группа не способна эффективно взаимодействовать с активированным мономером, поскольку ее нуклеофильность подавлена.

Среди различных путей решения данной проблемы наиболее изящным является применение стратегии одновременного депротонирования концевой аминокетильной группы ПНК и конденсации (методология нейтрализации *in situ*). Впервые такая методология была применена в 1987 г. для синтеза пептидов.<sup>122</sup> Было показано, что при получении пептидов Вос- и Fmoc-методами использование нейтрализации *in situ* приводит к существенному увеличению скорости конденсации.<sup>123–125</sup> Наиболее значительные успехи были достигнуты в синтезе пептидов с «трудными» последовательностями, которые особенно склонны к межцепочечной агрегации. При получении их традиционными методами, предусматривающими предварительную нейтрализацию концевой аминокетильной группы, возникают серьезные проблемы.<sup>126, 127</sup>

В последнее время методология нейтрализации *in situ* стала широко использоваться в синтезе ПНК наряду с традиционной методологией, когда депротонирование 5'-аминокетильных олигомеров ПНК проводится перед реакцией конденсации. В ряде случаев применение нейтрализации *in situ* позволяет избежать проблем, связанных с протеканием побочных реакций изомеризации ПНК, и повысить выход продукта конденсации.

## VII. Закономерности проведения реакции конденсации в синтезе пептидно-нуклеиновых кислот

Для детального понимания особенностей протекания процесса конденсации в синтезе ПНК и выявления рациональных путей его оптимизации уместно рассмотреть имеющиеся данные с позиции природы реагентов, применяемых для активации мономеров. Методы получения химерных молекул ПНК–ДНК описаны отдельно, поскольку в данном случае процесс конденсации характеризуется рядом важных особенностей.

### 1. Применение сложноэфирной и карбодиимидной активации

В первый раз метод активированных эфиров был успешно применен для синтеза тимидиновых олигомеров ПНК.<sup>1, 5</sup> В 1992 г. был осуществлен синтез тимидиновой ПНК с использованием в качестве мономера Вос-защитного пентафторфенилового (ПФФ) эфира тимидинового мономера ПНК.<sup>5</sup> При концентрации мономера 0.1 моль·л<sup>-1</sup> выход продукта реакции конденсации составил более 99%. Однако попытка применить этот метод для синтеза цитидиновых олигомеров ПНК не увенчалась успехом: выход целевого продукта в тех же условиях не превышал 50%.<sup>6</sup>

Известны примеры успешного использования метода активированных эфиров для синтеза ПНК гетерогенного состава. Так, описан синтез олигомеров ПНК из Fmoc/Z-защитных мономеров различного состава с применением сложноэфирной активации.<sup>97</sup> Это один из первых примеров применения Fmoc-стратегии для синтеза ПНК. В данном случае стратегия активированных эфиров позволила достичь довольно высокой эффективности конденсации.

Выходы продуктов конденсации составляли от 95 до 99% для олигомеров ПНК длиной до 20 остатков.<sup>97</sup> При синтезе ПНК, содержащей все четыре типа гетероциклических оснований, средний выход на стадию составил 97%, что соответствует 70%-ному выходу целевого олигомера. С учетом последующего выделения выход олигомера ПНК составил 43%.

Следует отметить, что выбор той или иной стратегии синтеза ПНК зачастую диктуется возможностью добиваться высоких выходов продуктов конденсации при экономном расходовании дорогостоящих мономеров ПНК, когда нежелательно использование многократных избытков мономеров (четырехкратных и больших). Использование Fmoc-стратегии в сочетании с ПФФ-активацией позволяет ограничиться двукратными избытками мономеров без повторения реакции конденсации.<sup>97</sup> Применение трехкратного или большего избытка мономеров не привело к заметному увеличению выхода продукта конденсации. Лучшей системой растворителей в данном случае оказалась смесь диметилсульфоксида (ДМСО) и *N*-метил-2-пирролидинона (МП) состава 1 : 4.<sup>97</sup> По-видимому, указанная система растворителей обеспечивает быстрый доступ реагентов к растущему олигомеру ПНК.<sup>128</sup> Однако при других методах активации более эффективны иные системы растворителей.

Таким образом, использование метода активированных эфиров для синтеза ПНК в некоторых случаях может привести к приемлемым результатам,<sup>12</sup> однако в большинстве случаев выход продуктов конденсации с использованием реагентов, активирующих *in situ*, выше (94–99%).<sup>1, 5</sup> В принципе, для синтеза ПНК с успехом может быть применена так называемая карбодиимидная активация (например, с участием дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) или *N,N'*-диизопропилкарбодиимида),<sup>12</sup> которая в некоторых случаях приводит к высоким выходам продуктов конденсации (до 98–99%).<sup>6, 7</sup> Основным недостатком данного метода активации является низкая скорость реакции конденсации ПНК.<sup>99</sup>

Так, применение карбодиимидной активации с использованием ДЦК приводит к количественным выходам продуктов присоединения тимидинового и цитидинового мономеров ПНК, в то время как пуриновые мономеры включаются в олигомер ПНК в этих условиях только частично, причем повторной конденсации оказывается недостаточно для того, чтобы добиться количественного выхода продукта присоединения.

Использование другого активирующего реагента, *N,N'*-диизопропилкарбодиимида, позволило достичь выходов, близких к количественным, даже для пуриновых мономеров,<sup>99</sup> однако в этом случае необходимо было использовать четырехкратные избытки мономеров и активирующего реагента, при этом время конденсации составляло не менее 60 мин.<sup>99</sup> Аналогично, для введения в олигомер ПНК аденинового мономера требовалась двукратная конденсация, а для введения гуанинового мономера — трехкратная.

Карбодиимидная активация часто оказывается удобной для получения аддуктов ПНК с другими молекулами. Так, описано получение гибридных ПНК-пептидных молекул, содержащих остатки биотина, которые придают ПНК способность эффективно проникать через клеточные мембраны.<sup>129</sup> Синтез пептидной части химерной молекулы проводили по стандартной методике пептидного синтеза,<sup>130</sup> синтез ПНК-части вели вручную с использованием Вос-стратегии на основе методик, предложенных в классической работе Нильсена.<sup>94</sup> Активацию осуществляли с помощью ДЦК в присутствии 1-гидроксисбензотриазола. Использовали пятикратный избыток мономера ПНК. Конденсацию проводили при повышенной температуре (37°C), чтобы увеличить выход целевого продукта.<sup>129</sup>

Известны и другие примеры использования Вос-стратегии в сочетании с карбодиимидной активацией<sup>94, 129</sup> для получения гибридных ПНК-пептидных молекул.<sup>49</sup> Такой подход к получению химерных молекул оправдан, поскольку в данном случае можно добиться полной совместимости условий синтеза пептидной и ПНК-частей гибрида.<sup>49</sup> Данный метод позволяет осуществлять синтез с общим выходом целевых соединений не менее 50%.<sup>49</sup>

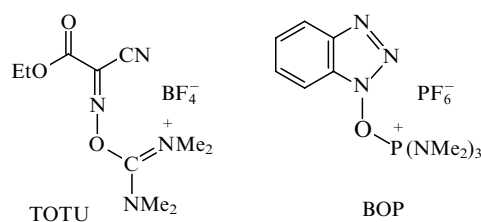
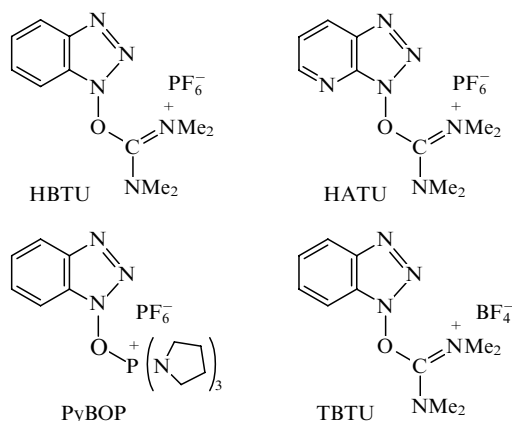
Метод карбодиимидной активации в сочетании с Вос/асул-стратегией, с успехом применяемый в пептидном синтезе,<sup>130</sup> позволяет получать также классические ПНК с *N*-(2-аминоэтил)глициновым остовом и молекулы ПНК с неканоническим остовом, содержащие оптически активные мономерные звенья, в которых глицин заменен на остатки других аминокислот: лизина, серина, изолейцина и глутаминовой кислоты.<sup>131</sup> Вставки мономеров на основе *D*-лизина в олигомеры ПНК увеличивают устойчивость дуплексов ПНК–ДНК и ПНК–РНК. В отсутствие таких мономерных звеньев устойчивость аналогичных дуплексов, как правило, оказывается низкой.<sup>131</sup>

Таким образом, использование сложноэфирной и карбодиимидной активации в отдельных случаях остается актуальным, например, при получении химерных ПНК-пептидных молекул и тимидиновых олигомеров ПНК. В некоторых случаях выходы продуктов конденсации с применением метода активированных ПФФ-эфиров могут быть даже выше, чем при использовании активации *in situ*.<sup>97</sup>

Тем не менее в настоящее время общепризнано,<sup>12</sup> что метод синтеза ПНК с применением реагентов на основе урониевых и фосфониевых солей, активирующих *in situ*, является наиболее подходящим и позволяет добиться более высоких выходов продуктов конденсации. За последние годы этот метод получил значительное развитие, так как именно он обеспечивает наиболее широкие возможности для получения ПНК и их производных.

## 2. Активация *in situ* реагентами на основе урониевых и фосфониевых солей

В качестве активирующих реагентов в синтезе ПНК чаще всего применяют гексафторфосфат *O*-(бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония (НВТУ), гексафторфосфат *O*-(7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония (НАТУ), гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)трис(пирролидино)фосфония (РуВОР), тетрафторборат *O*-(бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония (ТВТУ), тетрафторборат *O*-[(этоксикарбонил)цианометиламино]-1,1,3,3-тетраметилурония (ТОТУ) и гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)-трис(диметиламино)фосфония (ВОР), хотя известны и другие реагенты.



Поскольку процесс конденсации ПНК тесно связан с особенностями применяемой стратегии, в первую очередь с используемой комбинацией защитных групп, то целесообразно сгруппировать имеющиеся данные по активации *in situ* в три раздела, посвященные Вос-, Фмос- и ММТ-стратегиям синтеза ПНК.

### а. Вос-Стратегия

Вос/Z-Модификация Вос-стратегии является классической для синтеза ПНК. Для Вос/Z-варианта зависимость эффективности конденсации от различных факторов изучена довольно подробно.<sup>94</sup> Эта стратегия позволяет получать молекулы ПНК длиной более 15 звеньев, содержащие все четыре типа гетероциклических оснований, с высокими выходами. Использование карбодиимидной активации для синтеза таких олигомеров, как правило, менее эффективно.<sup>94</sup>

Изучение влияния таких факторов, как природа активирующего реагента, растворителей, концентрация мономера, природа органического основания (третичного амина), добавки катализаторов, на эффективность конденсации показало, что в случае применения активации *in situ* все они имеют важное значение для оптимизации условий конденсации.<sup>94</sup>

Сравнение эффективности конденсации под действием ряда урониевых активирующих реагентов, а именно широко используемых НВТУ и ТВТУ, а также относительно новых НАТУ и гексафторфосфата *O*-(1,2-дигидро-2-оксо-1-пиридил)-*N,N,N',N'*-бис(тетраметиле)урония (НДПУ), показало, что во всех случаях конденсация протекает эффективно, однако наибольший выход продукта присоединения, как правило, достигается под действием НВТУ.<sup>94, 100</sup>

Следует отметить, что эти результаты справедливы только при использовании системы растворителей ДМФА–пиридин, концентрации мономера ПНК 0.05 моль·л<sup>-1</sup> и концентрации основания — диэтил(циклогексил)амин (ДЭЦГА) — 0.1 моль·л<sup>-1</sup>. В этих условиях, независимо от природы мономера ПНК, средний выход продуктов конденсации составил 92.2–97.1%. Однако можно подобрать условия, когда другие активирующие реагенты будут действовать эффективнее, чем НВТУ (в другой системе растворителей или в присутствии другого основания). Таким образом, для каждого активирующего реагента требуется специальный подбор условий конденсации.

Сравнение эффективности действия НВТУ и РуВОР показало несколько более высокую эффективность НВТУ в выбранных условиях реакции. Общий выход олигомера ПНК при активации с использованием НВТУ и РуВОР составил соответственно 61 и 40%, что отвечает среднему выходу на стадию 97.1 и 94.7%.<sup>94, 100</sup> Следует отметить, что сравнение проводилось в условиях, оптимальных для использования НВТУ.

Система растворителей играет важную роль в обеспечении эффективного протекания конденсации. Так, при использовании смеси ДМФА–пиридин общий выход продукта составил 61%, при применении ДМФА — 55%, а при использовании смеси ДМФА–ДМСО — 22%.<sup>94</sup> Однако авторы не пишут, при использовании каких именно мономеров наблюдались самые низкие выходы ПНК. Отметим, что

такие данные отсутствуют практически во всех цитируемых работах, посвященных синтезу ПНК.

Сравнение влияния природы органического основания (третичного амина) на выход олигомера ПНК показывает, что применение 4-диметиламинопиридина (ДМАП), ДЭЦГА, метил(дициклогексил)амин и (дициклогексил)этиламина не менее эффективно, чем (диизопропил)этиламина (ДИПЭА), который широко используют в синтезе пептидов.<sup>94</sup>

Изменение природы третичного амина приводит к значительным различиям в выходах продукта конденсации (93.7–95.3%). Следует отметить, что применение ДИПЭА при проведении конденсации в выбранных условиях (в системе ДМФА–пиридин) не является оптимальным, поскольку он может образовывать с мономерами соли, нерастворимые в смеси этих растворителей. Однако имеются более подходящие условия для проведения этой реакции с участием ДИПЭА. Известно, например, что ДИПЭА эффективен в смеси растворителей МП–ДМСО.

Изучение влияния концентрации мономера ПНК на выход продукта конденсации показывает, что приемлемые выходы получаются при концентрациях мономеров не менее 0.1 моль·л<sup>-1</sup>. При более низких концентрациях (0.05 моль·л<sup>-1</sup>) конденсация, как правило, идет слишком медленно, что приводит к накоплению побочных продуктов, образующихся в результате протекания конкурирующих реакций.<sup>94</sup>

Показано, что при синтезе ПНК добавление в реакционную смесь каталитических количеств ДМАП и 1-гидроксibenзотриазола может оказывать негативное влияние на эффективность конденсации, хотя известно, что в случае пептидного синтеза их присутствие в реакционной смеси в ряде случаев способствует образованию амидной связи.<sup>94</sup>

Что касается загрузки<sup>†</sup> полимерного носителя, то она должна составлять не более 0.1–0.2 моль·экв·г<sup>-1</sup>, в этом случае достигается максимальный выход олигомера ПНК. Более высокая загрузка полимерного носителя может привести к снижению эффективности синтеза ПНК.<sup>94, 100</sup>

Применение Вос/Z-стратегии для синтеза ПНК позволяет достичь высоких выходов целевых продуктов (99.4%) при активации *in situ* с помощью активирующего реагента НАТУ в присутствии ДИПЭА.<sup>95</sup> Однако в этом случае в реакционной смеси требуется создавать многократный (например, семикратный) избыток мономера ПНК по отношению к загрузке полимерного носителя.<sup>95</sup> Обычно используют 10%-ный недостаток активирующего реагента и двукратный избыток третичного амина по отношению к мономеру ПНК.<sup>88</sup>

Приемлемые выходы достигаются при применении четырехкратного избытка мономеров ПНК в сочетании с активацией НАТУ (10%-ный недостаток на мономер) в присутствии смеси ДИПЭА и лутидина.<sup>47</sup> Если применять пятикратный избыток мономеров ПНК и десятикратный избыток ДИПЭА, можно достичь 92%-ного общего выхода олигомера ПНК.<sup>17</sup>

Часто повышению выхода способствует применение методологии предварительной активации мономера ПНК (преактивации): мономер ПНК и активирующий реагент смешивают и выдерживают несколько секунд перед введением в реакционную колонку.<sup>95, 96, 109, 110, 113, 115, 116</sup> Формально в этом случае уже нельзя говорить об активации *in situ*, однако традиционно понятие активации *in situ* связывают не с порядком смешения реагентов, а с природой активирующего реагента. Отметим, что методология пред-

активации не предусматривает выделения активированных мономеров. Как правило, используют 5–10%-ный недостаток активирующего реагента по отношению к мономеру.

Если использовать методику предварительной активации мономеров ПНК (выдерживание мономера и активирующего реагента в течение 2 мин) и вести конденсацию в смеси МП–пиридин, то можно добиться 90%-ного общего выхода олигомера ПНК. В зависимости от длины и состава последовательности выходы ПНК могут изменяться от 68 до 90%.<sup>88</sup>

Таким образом, при выборе рационального метода получения ПНК возникает альтернатива между быстрым и дешевым синтезом с применением небольшого избытка мономера ПНК, однако с невысокими (но приемлемыми) выходами продуктов конденсации, и длительным синтезом с большим расходом дорогостоящих мономеров и активирующих реагентов, однако с почти количественными выходами.

Попытки сформулировать основные условия эффективного синтеза ПНК предпринимались неоднократно.<sup>95</sup> При оптимизации процесса получения ПНК прежде всего уделяют внимание таким аспектам, как дешевизна и простота синтеза мономеров ПНК, близкие к количественным выходы продуктов конденсации, простота и эффективность процедуры выделения олигомера ПНК из реакционной смеси по окончании синтеза, возможность синтеза химерных молекул ДНК–ПНК, а также молекул ПНК, содержащих лиганды.

Такой выбор параметров оптимизации представляется оправданным, однако следует учитывать и ряд других моментов. Не менее важными факторами являются скорость процесса и его экономичность. Так, скорость конденсации должна быть высокой для сведения к минимуму протекания побочных процессов. Синтетическая стратегия прежде всего должна быть рациональной, т.е., оставаясь эффективной, предусматривать экономное расходование дорогостоящих мономеров ПНК и активирующих реагентов. Это имеет особую важность при организации крупномасштабного синтеза ПНК.

При сравнении Вос/Z- и Вос/acyl-стратегий синтеза ПНК предпочтение часто отдается последней, поскольку ее считают наиболее перспективной. И хотя средние выходы олигомеров на один цикл конденсации в обоих случаях достаточно высокие (не менее 98% в случае Вос/acyl-стратегии и около 99% в случае Вос/Z-стратегии), однако стандартная процедура выделения целевого продукта в случае Вос/acyl-стратегии позволяет получать до 65% олигомера ПНК (от загрузки носителя), а в случае Вос/Z-стратегии — всего ~20%.<sup>95</sup> Кроме того, с использованием Вос/acyl-стратегии можно получать химерные молекулы ПНК–ДНК и продукты присоединения к ПНК кислотоллабильных лигандов, недоступные в случае Вос/Z-стратегии.<sup>95</sup>

При синтезе тимидиновых олигомеров ПНК применяется только Вос-защита аминогруппы на 5'-конце, поскольку тимидиновый мономер ПНК не требует защиты гетероциклического основания.<sup>77, 79</sup> Такие олигомеры удобно синтезировать вручную.<sup>79</sup> В этом случае (по аналогии с предложенными ранее методиками<sup>94, 131, 132</sup>) Вос-стратегия используется в сочетании с активацией НВТУ в присутствии ДЭЦГА. Данный метод позволяет достичь высоких выходов продуктов конденсации, однако для этого необходимо ввести четырехкратный избыток мономера.<sup>79</sup>

Вос-Стратегия применима и для получения олигомеров ПНК, содержащих модифицированные звенья.<sup>131, 133–135</sup> Так, в состав молекул ПНК могут быть включены мономеры, несущие остатки антрахинона и акридина.<sup>133</sup> Такие олигомеры используются для изучения поведения шпилькообразующих ПНК в процессе плавления внутримолекулярных дуплексов ПНК–ПНК методом тушения флуоресценции (методом «молекулярных маяков»). Для достижения высо-

<sup>†</sup> Под загрузкой полимерного носителя понимают количество функциональных групп на единицу площади поверхности.



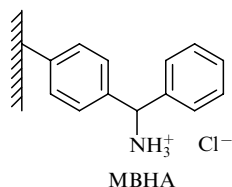
ких выходов продуктов конденсации на стадиях присоединения к олигомеру ПНК модифицированного мономера ПНК и следующего немодифицированного мономерного звена следует применять повторную конденсацию.<sup>133</sup>

Вос/Z-Метод в сочетании с активацией НВТУ<sup>94, 134</sup> позволяет синтезировать молекулы ПНК, меченные по N-концу флуоресцентными метками.<sup>134</sup> Такие производные ПНК могут применяться для обнаружения специфических НК-последовательностей. После гибридизации ПНК с комплементарной НК-мишенью флуоресценция метки может возрастать более чем в 50 раз по сравнению с флуоресценцией метки в составе свободной ПНК.<sup>134</sup>

Классическая Вос/Z-стратегия используется также для получения химерных молекул ПНК, содержащих кластеры модифицированных звеньев, например, с хиральным положительно заряженным остовом на основе остатков D-лизина.<sup>135</sup> Наличие таких звеньев в составе ПНК придает им полезные свойства.<sup>131, 135</sup> Химерные ПНК образуют с ДНК только антипараллельные дуплексы, в отличие от обычных ПНК, причем стабильность этих дуплексов существенно зависит от наличия некомплементарных пар. Уже одна такая пара резко снижает устойчивость гибридных дуплексов. В случае, когда некомплементарное звено располагается в центре кластера из трех модифицированных остатков, десятизвенный дуплекс ПНК–ДНК нестабилен даже при 15°C ( $\Delta T_m = 28^\circ\text{C}$ ). Такие ПНК могут послужить основой для создания инструментов генетической диагностики, используемых, в частности, для обнаружения точечных мутаций.

При получении этих производных ПНК с использованием Вос-стратегии в сочетании с активацией НВТУ в присутствии ДЭЦГА в качестве основания<sup>131, 136</sup> общий выход хиральных олигомеров составил 80–90%,<sup>135</sup> а оптическая чистота — не менее 90%.

В большинстве случаев в Вос-стратегии синтеза ПНК используют стандартный полимерный носитель МВНА с (4-метилбензгидрил)аминогруппами.<sup>11, 131, 132, 135, 136</sup>



Отщепление олигомеров ПНК от твердой фазы осуществляют с помощью смеси  $\text{CF}_3\text{COOH} - \text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ .<sup>11, 131, 136</sup>

Вос-Стратегия позволяет применять различные активирующие реагенты, в том числе ВОР.<sup>137</sup> Используя этот реагент и ДИПЭА в качестве основания, можно добиться высоких выходов продуктов конденсации в таких системах растворителей, как ДМФА– $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и ДМФА–ДМСО. В этом случае достаточно введения двукратного избытка мономеров ПНК, однако для эффективного присоединения мономеров каждую реакцию конденсации целесообразно повторять дважды.<sup>137</sup>

Синтез ПНК с применением Вос/Z-стратегии в сочетании с активацией *in situ* с использованием ТВТУ<sup>113</sup> можно вести по методике, предложенной в классической работе Нильсена (в среде ДМФА–пиридин),<sup>94</sup> однако эффективнее проводить конденсацию в ДМФА в присутствии ДЭЦГА в качестве основания (двукратный избыток на мономер). Это связано с хорошей растворимостью образующихся солей мономеров ПНК в ДМФА.<sup>113</sup> Оптимальным в этом случае является трехкратный избыток мономера. Данный метод позволяет использовать в качестве предшественника гуанина 2-амино-

6-бензилоксипуридин с незащищенной аминогруппой.<sup>113</sup> Чтобы избежать побочного процесса кепирования олигомерной цепи, используют 10%-ный недостаток ТВТУ по отношению к мономеру ПНК.<sup>113</sup> С той же целью полезно применять методику преактивации мономера ПНК в течение 5 мин.<sup>96</sup>

Побочная реакция кепирования олигомерной цепи возможна и в синтезе ПНК, и в пептидном синтезе.<sup>123</sup> Ее протекание зависит от наличия в реакционной смеси свободного активирующего реагента. Если активирующий реагент взят в избытке по отношению к аминокислоте, то после деблокирования концевая аминогруппа пептида способна взаимодействовать как с активированным производным аминокислоты, так и с активирующим реагентом.<sup>123</sup> Так, при избытке НВТУ наблюдали образование тетраметилгуанидинового производного, стабильного в условиях дальнейшего наращивания пептидной цепи.<sup>138</sup> Для исключения этого побочного процесса активирующий реагент нужно брать в небольшом недостатке по отношению к мономеру (5–20%).<sup>113</sup>

При использовании в качестве активирующего реагента ТВТУ возможно также протекание другой побочной реакции — N-ацильного переноса.<sup>94, 113, 123</sup> Чтобы избежать этого побочного процесса, целесообразно применять методологию нейтрализации *in situ*.<sup>123</sup> Для этого конденсацию проводят в присутствии основания без предварительной нейтрализации 5'-концевой первичной аминогруппы олигомера.<sup>113</sup> За эффективностью протекания конденсации следят с помощью ВЭЖХ-анализа аликутов, которые получают соответствующей обработкой небольшого количества полимерного носителя (3–5 мг) после завершения цикла присоединения очередного мономерного звена.<sup>113</sup>

При синтезе тимидиновых олигомеров ПНК с использованием Вос-стратегии и активирующего реагента ТВТУ иногда наблюдается снижение выхода продукта конденсации после присоединения первых трех-четырёх мономерных звеньев.<sup>113</sup> В результате происходит накопление укороченных цепей, а общий выход ПНК не превышает 30% (для 10-звенного олигомера). Та же проблема иногда возникает при применении НАТУ. По-видимому, низкий выход объясняется агрегацией растущих тимидиновых олигомеров ПНК. Частично эта проблема может быть решена добавлением на С-конец цепей ПНК остатка лизина, который препятствует межцепочечной агрегации олигомеров.

Характерно, что при получении олигомеров ПНК гетерогенного состава, содержащих остатки мономеров всех четырех типов, сильного падения выхода в процессе синтеза ПНК не наблюдается.<sup>113</sup> В этом случае выход на каждой стадии конденсации достигает 97%, что соответствует 66%-ному общему выходу целевого 16-звенного олигомера.

Иногда сходная проблема, связанная с агрегацией цепей ПНК, возникает и при удалении защитных Z-групп с экзоциклических аминогрупп гетероциклических оснований после окончания синтеза ПНК, что приводит к существенному снижению выхода ПНК.<sup>11, 113</sup> При этом основную роль играет комплементарное спаривание олигомеров — как межцепочечное, так и внутримолекулярное. Уже четырехзвенные дуплексы ПНК–ПНК существенно затрудняют постсинтетические обработки олигомеров ПНК.<sup>113</sup> В этой связи при планировании синтеза последовательности звеньев в олигомере ПНК следует подвергать анализу на предмет возможного образования внутримолекулярных шпилек и межмолекулярных кластеров. Было найдено, что при включении в состав гетероолигомера ПНК остатка лизина общий выход ПНК можно довести до 75% и более, так как заряженная ε-аминогруппа лизина частично препятствует агрегации цепей ПНК.

Из сказанного следует, что эффективность синтеза олигомера ПНК независимо от выбранного метода получения во многом определяется свойствами синтезируемой последовательности ПНК.<sup>139</sup> В то время как теоретически в состав ПНК могут быть включены любые комбинации мономеров, на практике осуществить синтез некоторых последовательностей с количественным выходом бывает трудно. Так, присоединение пуринового мономера к последовательности олигомера ПНК, содержащей на 5'-конце пуриновое основание, затруднено. С учетом этого при синтезе ПНК, содержащих пуриновые кластеры, целесообразно проводить повторные конденсации.<sup>139</sup> Самый низкий выход наблюдался при синтезе олигомеров ПНК, содержащих несколько гуаниновых звеньев подряд.

В заключение раздела следует отметить, что Вос-стратегия может быть реализована как в «ручном», так и в автоматическом варианте.<sup>139</sup> И хотя «ручной» синтез представляется довольно эффективным и недорогим,<sup>140</sup> тем не менее автоматический синтез с использованием пептидных и олигонуклеотидных синтезаторов наиболее перспективен.<sup>141</sup> Это связано с тем, что «ручное» получение ПНК длительно и трудоемко, а кроме того требует для достижения приемлемых выходов продуктов конденсации проведения синтеза в крупном масштабе (не менее 5 ммоль).

## 6. Fmoc-Стратегия

Общепризнано, что для реализации Fmoc-стратегии синтеза ПНК<sup>14, 77, 96, 100–106, 114</sup> требуются более мягкие условия, чем для Вос-стратегии,<sup>12</sup> в частности, отпадает необходимость в обработке олигомера ПНК сильными кислотами в процессе и по окончании синтеза. Это позволяет использовать другие защитные группы для экзоциклических аминогрупп гетероциклических оснований мономеров ПНК. В результате Fmoc-стратегия позволяет достичь более высокой чистоты реакционных смесей и лучших общих выходов олигомеров ПНК. Особенно перспективной является Fmoc/acyl-стратегия синтеза ПНК,<sup>77, 104, 105</sup> которая может быть использована также для получения химерных молекул ПНК–ДНК и ПНК–пептид.

Известны различные модификации Fmoc-стратегии. Так, Bhoc-защита гетероциклических оснований мономеров ПНК в сочетании с активацией реагентом HATU позволяет вести синтез в автоматическом режиме на олигонуклеотидном синтезаторе.<sup>106</sup> В этом случае в качестве основания эффективнее всего использовать смесь ДИПЭА и лутидина. В присутствии смеси этих оснований достигается более высокий выход продуктов конденсации ПНК, чем в присутствии только одного из них.<sup>106</sup>

Хорошим растворителем для проведения конденсации Fmoc-методом является ДМФА, а одним из лучших активирующих реагентов — HATU.<sup>141</sup> Однако и в этом случае при получении отдельных олигомеров ПНК могут возникнуть проблемы, связанные с неэффективным протеканием конденсации.<sup>141</sup> Так, при синтезе олигомеров ПНК, последовательности которых содержат несколько идентичных гетероциклических оснований подряд (причем не только пуриновых), наблюдается образование укороченных продуктов. Эта проблема частично может быть решена при использовании повторной конденсации.<sup>141</sup>

Двукратную конденсацию следует проводить в следующих случаях: при синтезе последовательностей, содержащих четыре или более идентичных остатка подряд после присоединения к олигомеру двух или трех одинаковых мономеров ПНК; при синтезе олигомеров ПНК, содержащих пуриновые кластеры; при синтезе 18-звенных и более протяженных

олигомеров ПНК независимо от состава последовательности после присоединения 17-го звена.<sup>141</sup>

При использовании Fmoc-стратегии в сочетании с активацией HATU выходы ПНК варьируют от 26 до 38%.<sup>141</sup> Иногда общий выход олигомера ПНК не зависит от длины последовательности: в этом случае суммарный выход продукта определяется эффективностью присоединения первого мономера ПНК к полимерному носителю, так как выход продукта первой конденсации может быть ниже выхода продуктов последующих конденсаций.<sup>141</sup>

В большинстве случаев для анализа реакционных смесей и выделения целевых продуктов применяют метод обращенно-фазовой ВЭЖХ, причем используют условия разделения пептидов, а не олигонуклеотидов.<sup>141</sup> При использовании Fmoc-стратегии эффективность конденсации можно оценивать спектрофотометрически, измеряя (в интервале 256–301 нм) УФ-поглощение продукта, образующегося при удалении Fmoc-группы под действием пиперидина. Этот метод довольно удобен для пошагового мониторинга процесса олигомеризации ПНК.<sup>97</sup>

Таким образом, Fmoc-стратегию рационально использовать для синтеза олигомеров ПНК, получение которых с помощью других стратегий затруднено. Данный метод допускает внесение различных изменений в синтетический протокол с целью увеличения выхода продуктов конденсации в отдельных циклах синтеза.<sup>141</sup>

Проблема недостаточной эффективности конденсации, возникающая при синтезе ПНК с применением Fmoc-стратегии, по-видимому, имеет те же причины и пути решения, что и сходная проблема в пептидном синтезе.<sup>142</sup> Известно, что во многих случаях трудности автоматического твердофазного синтеза пептидов связаны с характером синтезируемой последовательности.<sup>142</sup> При этом причиной низкой эффективности конденсации является формирование в ходе синтеза объемной пространственной структуры синтезируемого пептида, что может препятствовать образованию амидной связи.

Склонные к межцепочечной агрегации фрагменты пептидной цепи также могут снижать доступность аминогруппы и препятствовать наращиванию цепи.<sup>120</sup>

Пространственные затруднения, возникающие в процессе синтеза ПНК, способны замедлять удаление защитной Fmoc-группы с 5'-конца олигомера ПНК, а также снижать эффективность последующей конденсации.<sup>143</sup>

Особой сложностью отличается синтез ПНК, богатых пуринами. Если в последовательности ПНК подряд стоит более двух пуриновых остатков, то для эффективного присоединения следующего пуринового мономера требуется увеличение времени реакции, а во многих случаях и многократное (двух- и трехкратное) повторение конденсации. Очень медленно происходит присоединение гуанинового мономера к 5'-концевому гуаниновому звену.

В случае применения Fmoc-стратегии, как и в случае применения Вос-стратегии, одной из основных причин низкой эффективности конденсации является агрегация цепей ПНК. При получении полностью или частично самокомплементарных последовательностей могут возникнуть сложности, связанные с внутривещечной ассоциацией олигомеров ПНК. Кроме того, в процессе синтеза на поверхности носителя могут создаваться условия, благоприятные для межмолекулярной агрегации растущих олигомеров. Так, склонность к агрегации проявляют тимидиновые олигомеры ПНК (четырёхзвенные и более протяженные) и ПНК, богатые пуринами.

На эффективность реакции конденсации существенное влияние оказывают такие факторы, как нагрузка полимер-

ного носителя и состав растворителей. Так, низкая плотность «растущих» на твердой фазе олигомеров может способствовать решению проблемы межмолекулярной агрегации цепей ПНК, а растворители могут препятствовать межмолекулярной и внутримолекулярной агрегации молекул ПНК (образованию шпилек), а также обеспечивать эффективную диффузию реагентов к N-концу синтезируемых цепей ПНК.

В настоящее время работы по оптимизации условий синтеза ПНК продолжают, так как до сих пор не существует идеального метода получения ПНК. Наиболее отработанной является Fmoc/asyl-стратегия синтеза ПНК, которая позволяет получать олигомеры любого состава с высоким выходом.<sup>104, 115</sup>

Так, при синтезе тимидиновых олигомеров ПНК Fmoc/asyl-методом в сочетании с активацией HATU достаточно использовать двукратные избытки мономеров<sup>115</sup> и 20%-ный недостаток активирующего реагента. В качестве растворителя лучше применять МП, а в качестве основания — смесь ДИПЭА и лутидина. Полезно проводить преактивацию мономеров ПНК (2 мин). В этом случае выход продукта на каждой стадии конденсации составляет 85–90% (при времени конденсации 30 мин), а общий выход 7-членного олигомера — не менее 50%.<sup>115</sup> Мониторинг эффективности процесса удобно осуществлять спектрофотометрически.

Предпринимались попытки оптимизировать условия конденсации на модельных системах в растворе, в качестве которых использовали смеси мономеров ПНК и эфиров аминокислот.<sup>115</sup> Возможность прямого приложения данных, полученных на такого рода модельных системах, к твердофазному синтезу ПНК вызывает некоторые сомнения, поскольку оптимальные условия синтеза в растворе и на полимерном носителе могут принципиально различаться. Это следует принимать во внимание при выборе модельных систем. Тем не менее иногда результаты таких исследований представляют определенную ценность.

При конденсации мономеров ПНК с *трет*-бутиловым эфиром L-фенилаланина независимо от природы активирующего реагента (HATU или HBTU в присутствии 1-гидроксibenзотриазола), третьего амина (*N*-метилморфолин, лутидин или смесь ДИПЭА и лутидина) и растворителя (ДМФА или МП) выход продуктов конденсации составлял не менее 95%, причем природа основания и активирующего реагента практически не влияли на эффективность процесса. Лучший результат был достигнут при использовании активации HATU в присутствии лутидина в среде ДМФА.<sup>115</sup>

Выше упоминалось, что иногда общий выход олигомера ПНК зависит от эффективности присоединения к полимерному носителю первого мономера. Так, при синтезе ПНК гетерогенного состава с применением Fmoc/asyl-стратегии в сочетании с традиционной HBTU-активацией в присутствии 1-гидроксibenзотриазола и лутидина выход продукта присоединения первого цитозинового мономера к полимерному носителю «Tentagel» не превышал 50%,<sup>115</sup> тогда как выходы продуктов на последующих стадиях конденсации составляли не менее 80%. Эффективность присоединения первого мономера ПНК можно увеличить до 80% и более, применяя повторную конденсацию, в этом случае время каждой конденсации может быть снижено.<sup>115</sup> На низкий выход продукта присоединения первого мономерного звена к полимерному носителю указывается и в работе<sup>141</sup>.

Одними из лучших условий конденсации с использованием Fmoc/asyl-стратегии синтеза ПНК являются двукратный избыток мономера (концентрация 0.125 моль·л<sup>-1</sup>), преактивация смесью HATU (20%-ный недостаток), ДИПЭА и лутидина (1–2 мин), конденсация в течение 20 мин, повторная конденсация в каждом цикле (а не только

в первом) синтеза. В этих условиях общий выход ПНК гетерогенного состава достигает 43% (для 16-звенного олигомера), что соответствует среднему выходу продукта конденсации 95% (при этом присоединение первого мономерного звена протекает с хорошим выходом). Недостатком является необходимость повторения конденсации в каждом цикле синтеза.<sup>115</sup> Рациональность такого подхода несколько сомнительна, хотя он имеет существенное преимущество — надежную воспроизводимость результатов синтеза.

## в. ММТ-Стратегия

Эта стратегия синтеза ПНК является довольно перспективной,<sup>38, 96, 107–112, 116, 144, 145</sup> особенно ее ММТ/asyl-модификация,<sup>96, 107, 110, 116</sup> полностью совместимая с условиями олигонуклеотидного синтеза. Она позволяет использовать для получения ПНК автоматические ДНК-синтезаторы без изменения их конструкции или программного обеспечения, что особенно удобно для синтеза химерных молекул ПНК–ДНК.

В ММТ-стратегии можно применять различные активирующие реагенты,<sup>38, 112, 144, 145</sup> в том числе мезитилсульфонилоксибензотриазол (TMSOBt)<sup>112</sup> и 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилоксибензотриазол (TPSOBt).<sup>144</sup> Использование последнего приводит к более высоким выходам продуктов конденсации (средний выход в одном цикле достигает 96%), чем использование коммерчески доступного активирующего реагента РувОР.<sup>112, 144</sup> В зависимости от природы мономера ПНК и 5'-концевого звена олигомера выход на каждой стадии конденсации может изменяться от 91 до 99%.<sup>144</sup>

В случае применения ММТ-стратегии эффективность конденсации можно оценивать спектрофотометрически, измеряя УФ-поглощение катиона ММТ<sup>+</sup>, образующегося на стадии удаления защитной ММТ-группы с 5'-концевой аминогруппы олигомера ПНК. ММТ-Стратегия в сочетании с TPSOBt-активацией может быть реализована на олигонуклеотидных синтезаторах.<sup>112</sup> Этим способом впервые были получены молекулы ПНК, содержащие остатки урацила.<sup>112</sup> ММТ-Стратегия довольно эффективна и в «ручном» варианте, например, при получении тимидиновых олигомеров ПНК.<sup>38</sup>

Использование активирующего реагента РувОР позволяет достичь на каждой стадии присоединения мономерного звена выходов, равных 95–99%.<sup>96</sup> Однако в этом случае требуется применение концентрированных (0.3 М) растворов мономеров ПНК и РувОР. В качестве основания лучше использовать *N*-этилморфолин, полезно применять также процедуру преактивации мономера ПНК.<sup>96</sup>

ММТ-Стратегия применяется для синтеза фосфонатных аналогов ПНК (фПНК).<sup>110, 116, 146, 147</sup> Наличие в структуре остова фПНК отрицательно заряженных групп придает таким аналогам ПНК улучшенную растворимость в водных растворах по сравнению с классическими олигомерами ПНК. Эти молекулы способны специфично связываться с комплементарными фрагментами ДНК и РНК, хотя температура плавления комплексов фПНК–НК несколько ниже температуры плавления соответствующих комплексов ПНК–НК.

Для синтеза фПНК эффективно применение ММТ/asyl-стратегии в сочетании с активацией триизопропилбензолсульфонилнитротриазолом.<sup>110, 116, 146, 147</sup> Проведение конденсации в присутствии *N*-метилимидазола в качестве нуклеофильного катализатора позволяет добиться 95%-ного среднего выхода на стадии конденсации при времени реакции 10 мин.<sup>110, 116</sup> Общий количественный выход продуктов конденсации в этом случае не достигается, однако

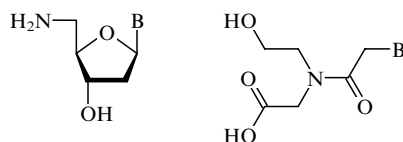
возможность использования разбавленных растворов мономеров ПНК (0.05 М) и активирующего реагента (0.06 М) в сочетании с процедурой преактивации, предусматривающей предварительное смешивание мономера ПНК с активирующим реагентом и *N*-метилимидазолом, делает этот метод привлекательным.<sup>110, 116</sup>

### 3. Особенности получения химерных молекул ПНК – ДНК

В последние годы возрос интерес к химерным молекулам ПНК – ДНК, что стимулировало активное развитие методов их получения.<sup>77, 109, 111, 144, 148 – 150</sup> Применение классических ПНК в биохимических исследованиях ограничено из-за их довольно низкой растворимости в водных растворах и склонности к самоагрегации,<sup>4, 12, 34</sup> а также из-за плохой способности к прохождению через клеточные мембраны.<sup>4, 9, 84, 151</sup> Последнее обстоятельство является основным фактором, ограничивающим применение канонических олигомеров ПНК в качестве антисенсовых агентов *in vivo*.<sup>9</sup>

Химерные молекулы ПНК – ДНК лишены большинства этих недостатков. Они обладают всеми преимуществами ПНК и вместе с тем сохраняют присущие ДНК полезные свойства. Действительно, полученные к настоящему времени химерные молекулы ПНК – ДНК сочетают биологическую устойчивость, высокую аффинность и избирательность связывания с НК-мишенями, присущие ПНК, с превосходной растворимостью и способностью активировать направленный гидролиз РНК-мишени РНКазой H, присущими ДНК.<sup>9, 34</sup> Химерные молекулы ПНК – НК находят многообразные применения: они перспективны как терапевтические агенты, в том числе антисенсовые;<sup>9</sup> на их основе могут быть созданы эффективные диагностические препараты и чувствительные биомолекулярные зонды.<sup>77, 96, 107 – 109, 144, 148, 149</sup> Выделение методов синтеза гибридных молекул ПНК – НК в отдельный раздел продиктовано особенностями протекания процесса конденсации.

Одним из важнейших условий успешного синтеза этих соединений является правильный выбор структуры линкерного звена между фрагментами ПНК и ДНК химерной молекулы. В зависимости от того, какой фрагмент гибридной молекулы является 5'-концевым — ПНК или ДНК — в качестве линкерного звена используют соответственно или модифицированные нуклеозиды, например 5'-амино-2',5'-дидезоксинуклеозиды,<sup>77, 149</sup> или модифицированные мономеры ПНК, например мономеры на основе *N*-(2-гидроксиэтил)глицина.<sup>148</sup>



Описано получение обоих возможных типов гибридных молекул ПНК – ДНК, а именно 5'-ПНК – ДНК-3' и 5'-ДНК – ПНК-3'. Благодаря заряженному остову фрагмента ДНК химерные молекулы ПНК – ДНК превосходно растворяются в водных растворах, что позволяет использовать для их выделения и анализа стандартные методы, такие как электрофорез в полиакриламидном геле и ионообменную или обращенно-фазовую ВЭЖХ.<sup>108</sup>

Если 5'-концевым является фрагмент ПНК, то ПНК- и ДНК-части соединяются амидной связью. В этом случае в качестве линкерного звена часто используют 5'-амино-2',5'-дидезоксинуклеозиды.<sup>77</sup> Гибридные молекулы такого типа могут быть получены различными методами. Так, для син-

теза гибридных молекул 5'-ПНК – ДНК-3' может быть применена классическая Вос/Z-стратегия, использующаяся в синтезе ПНК-пептидных конъюгатов.<sup>152</sup> Однако при получении этим путем химерных молекул ПНК – ДНК, содержащих остатки пуриновых нуклеотидов, на стадии деблокирования гетероциклических оснований, входящих в состав фрагмента ПНК, может возникнуть опасность кислотно-катализируемой апуринизации фрагмента ДНК.<sup>77</sup> Поэтому такой вариант синтеза может использоваться только для получения гибридных молекул ПНК – ДНК, содержащих в составе фрагмента ДНК более устойчивые пиримидиновые нуклеотиды, а для получения химерных молекул 5'-ПНК – ДНК-3' лучше использовать Fmoc/asyl-стратегию синтеза ПНК.<sup>77</sup>

Когда 5'-концевым фрагментом гибридной молекулы является фрагмент ДНК, то ПНК- и ДНК-части могут образовывать фосфамидную связь без использования специального линкерного звена. В этом случае для синтеза фрагмента ПНК можно применять Fmoc/asyl-стратегию. При использовании тимидинового мономера допустимо применение Вос-защиты 5'-концевой аминогруппы. Активацию осуществляют с помощью НАТУ в присутствии ДИПЭА и ДМАП; конденсацию проводят в ДМФА. В данном случае недопустимо использование кислотолабильных групп для защиты гетероциклических оснований мономеров, входящих в состав ПНК, так как их снятие будет сопровождаться гидролизом фосфамидной связи.<sup>77</sup>

Для получения ПНК-фрагмента таких химерных олигомеров часто применяют ММТ/asyl-стратегию. В этом случае условия синтеза ПНК совместимы с условиями олигонуклеотидного синтеза.<sup>34, 149</sup> ПНК-Фрагмент можно синтезировать вручную. Конденсацию проводят в смеси ДМФА – пиридин с использованием тетрафторбората 2-(2-оксо-1(2*H*)-пиридил)-1,1,3,3-бис(пентаметиле)уридия (ТОРРiрU) в качестве активирующего реагента и ДЭЦГА в качестве основания.<sup>153</sup> В этих условиях конденсация с участием тимидиновых и цитидиновых мономеров ПНК протекает легко, в отличие от пуриновых мономеров, которые не способны эффективно присоединяться к растущей цепи.<sup>149</sup> При применении в качестве активирующего реагента НАТУ, в качестве основания — ДИПЭА, в качестве растворителя — ацетонитрила и использовании пятикратного избытка мономеров ПНК (для достижения высоких выходов продуктов конденсации) время реакции составляет не менее 15 мин.<sup>34</sup> Этим методом были синтезированы химерные молекулы, содержащие остатки 5-бромурацила и 5-метилцитозина.<sup>34</sup> Показано, что включение в состав ПНК-цепи химерных молекул остатков 5-метилцитозина повышает устойчивость их дуплексов и триплексов с комплементарными ДНК.<sup>34</sup>

В качестве линкера между ДНК- и ПНК-частями химерных молекул типа 5'-ДНК – ПНК-3' часто используют модифицированный тимидиновый мономер ПНК на основе *N*-(2-гидроксиэтил)глицина,<sup>34, 107, 148</sup> причем синтез 5'-ДНК – ПНК-3' можно проводить в рамках как Вос,<sup>148</sup> так и ММТ-стратегии.<sup>34, 107</sup> При использовании Вос/Z-стратегии синтез ПНК-фрагмента ведут на твердой фазе, в этих же условиях присоединяют линкерное звено.<sup>148</sup> Последующий синтез ДНК-фрагмента гибридной молекулы также необходимо осуществлять в твердой фазе. Недопустимо вести синтез ДНК-фрагмента в растворе, так как растворимость олигомеров ПНК, лишенных защитных групп, в органических растворителях недостаточно высока для эффективной конденсации с амидофосфитными производными нуклеозидов.<sup>148</sup>

Более эффективно использовать для синтеза 3'-ПНК-фрагмента твердофазный ММТ-метод, и после окончания синтеза ПНК, не отщепляя олигомер от носителя, продолжить твердофазный синтез ДНК-фрагмента. Однако в этом

случае нельзя использовать мономеры ПНК, в которых гетероциклические основания защищены кислотолабильными защитными группами, поскольку ДНК-фрагмент не выдержит кислотной обработки, необходимой для удаления этих защитных групп. Данный метод не позволяет синтезировать химерные молекулы, содержащие остатки мономеров ПНК всех четырех типов, однако с его помощью можно получать гибридные соединения, ПНК-фрагмент которых состоит из остатков пиримидиновых мономеров.<sup>148</sup>

ММТ/asyl-Модификация данного метода синтеза ПНК лишена описанных выше недостатков. Она позволяет синтезировать гибридные молекулы ПНК–ДНК, содержащие все четыре типа гетероциклических азотистых оснований в обоих фрагментах — ДНК и ПНК.<sup>108, 109, 150</sup>

ММТ/asyl-Стратегия позволяет вести синтез в полностью автоматическом режиме на олигонуклеотидном синтезаторе. Получение ДНК-части гибридной молекулы осуществляется стандартным амидофосфитным методом с применением коммерчески доступных амидофосфитных производных 2'-дезоксинуклеозидов.<sup>108</sup> Такой метод получения химерных молекул ПНК–ДНК практически не имеет недостатков.<sup>108, 150</sup>

Для синтеза ПНК-части олигомеров типа 5'-ПНК–ДНК-3' можно использовать активацию НВТУ в присутствии ДИПЭА в смеси ДМФА–ацетонитрил.<sup>150</sup> Следует брать не менее чем 0.1 М (лучше 0.2 М) растворы мономеров ПНК и активирующего реагента; полезно также применять методику преактивации. В качестве линкерного звена между ПНК- и ДНК-фрагментами удобно использовать коммерчески доступное амидофосфитное производное аминоксанола, которое присоединяется к 5'-концу ДНК-фрагмента по стандартному протоколу олигонуклеотидного синтеза, после чего можно вести синтез 5'-концевой ПНК-части химерной молекулы.<sup>150</sup>

ММТ/asyl-Стратегия дает возможность синтезировать химерные молекулы состава 5'-ПНК–ДНК–ПНК-3'.<sup>109</sup> В этом случае синтез обоих ПНК-фрагментов проводится в автоматическом режиме с использованием активации НВТУ в присутствии ДИПЭА в смеси ДМФА–ацетонитрил, при этом могут потребоваться восьмикратные избытки реагентов по отношению к нагрузке носителя. Использование методики преактивации ПНК-мономеров позволяет улучшить эффективность конденсации и довести средний выход присоединения мономерного звена до 96%.<sup>109</sup>

Так или иначе, вопрос об эффективности каждого конкретного подхода к синтезу молекул ПНК в принципе не имеет однозначного решения. Выбор наиболее адекватной стратегии синтеза ПНК зависит от поставленных целей и имеющихся возможностей и определяется тем, сколько олигомеров ПНК, в каком количестве, какого состава и какой степени чистоты необходимо получить.

## VIII. Заключение

При разработке оптимального метода получения олигомеров ПНК необходимо найти разумный компромисс между эффективностью и экономичностью процесса синтеза ПНК.

С одной стороны, безусловно, нужно добиваться увеличения выхода продукта реакции конденсации. При этом выбор стратегии синтеза должен быть комплексным и учитывать не только природу активирующего реагента, но и другие аспекты, освещенные в настоящем обзоре.

С другой стороны, синтез ПНК должен быть рациональным. Это означает, что процесс получения ПНК должен быть не только эффективным, но и быстрым, а по возможности и дешевым. В настоящем обзоре были приведены примеры обоих подходов к синтезу ПНК.

В низкобюджетных лабораториях, в которых прежде всего преследуется цель сделать синтез ПНК экономным, в большинстве случаев используют «медленный синтез». Он является довольно трудоемким, но дает превосходные выходы на стадии конденсации.

В крупных биотехнологических компаниях, производящих олигомеры ПНК для продажи, как правило, применяют «быстрый синтез». Здесь для достижения высоких выходов продуктов конденсации используют обычно многократные избытки мономеров ПНК и лучших активирующих реагентов. Однако из-за сокращения времени конденсации достичь количественных выходов в «быстром синтезе» не удастся, поэтому для получения чистых олигомеров ПНК требуется применение комплексной процедуры выделения.

Наиболее рациональные синтетические стратегии объединяют лучшие черты обоих подходов («медленного» и «быстрого») к получению ПНК.

Работа выполнена в рамках Государственной программы поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (грант 00-15-97944).

## Литература

1. P.E.Nielsen, M.Egholm, R.H.Berg, O.Buchardt. *Science*, **254**, 1497 (1991)
2. M.Egholm, O.Buchardt, L.Christensen, C.Behrens, S.M.Freier, D.A.Driver, R.H.Berg, S.K.Kim, B.Norden, P.E.Nielsen. *Nature (London)*, **365**, 566 (1993)
3. B.Hyrup, M.Egholm, P.E.Nielsen, P.Wittung, B.Norden, O.Buchardt. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 7964 (1994)
4. P.E.Nielsen. *Acc. Chem. Res.*, **32**, 624 (1999)
5. M.Egholm, O.Buchardt, P.E.Nielsen, R.H.Berg. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1895 (1992)
6. M.Egholm, P.E.Nielsen, O.Buchardt, R.H.Berg. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9677 (1992)
7. M.Egholm, C.Behrens, L.Christensen, R.H.Berg, P.E.Nielsen, O.Buchardt. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 800 (1993)
8. P.E.Nielsen, G.Haaima. *Chem. Soc. Rev.*, **26**, 73 (1997)
9. H.J.Larsen, T.Bentin, P.E.Nielsen. *Biochim. Biophys. Acta*, **1489**, 159 (1999)
10. K.L.Dueholm, P.E.Nielsen. *New J. Chem.*, **21**, 19 (1997)
11. P.Wittung, P.E.Nielsen, O.Buchardt, M.Egholm. *Nature (London)*, **368**, 561 (1994)
12. E.Uhlmann, A.Peyman, G.Breipohl, D.W.Will. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **37**, 2796 (1998)
13. P.E.Nielsen, M.Egholm, O.Buchardt. *Bioconj. Chem.*, **5**, 3 (1994)
14. B.Hyrup, P.E.Nielsen. *Bioorg. Med. Chem.*, **4**, 5 (1996)
15. S.C.Brown, S.A.Thompson, J.M.Veal, D.G.Davis. *Science*, **265**, 777 (1994)
16. M.Eriksson, P.E.Nielsen. *Q. Rev. Biophys.*, **29**, 369 (1996)
17. N.Sugimoto, N.Satoh, K.Yasuda, S.-I.Nakano. *Biochemistry*, **40**, 8444 (2001)
18. M.Leijon, A.Graslund, P.E.Nielsen, O.Buchardt, B.Norden, S.M.Kristensen, M.Eriksson. *Biochemistry*, **33**, 9820 (1994)
19. M.Eriksson, P.E.Nielsen. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 410 (1996)
20. R.Rasmussen, J.S.Kastrup, J.N.Nielsen, J.M.Nielsen, P.E.Nielsen. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 98 (1997)
21. C.Meier, J.Engels. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **31**, 1008 (1992)
22. D.J.Rose. *J. Anal. Chem.*, **65**, 3545 (1993)
23. W.M.Pardridge, R.J.Boado, Y.-S.Kang. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5592 (1995)
24. J.C.Norton, M.A.Piatyszek, W.E.Wright, J.W.Shay, D.R.Corey. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 615 (1996)
25. V.V.Demidov, V.N.Potaman, M.D.Frank-Kamenetskii, M.Egholm, O.Buchardt, S.H.Sonnichsen, P.E.Nielsen. *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1310 (1994)
26. L.Good, P.E.Nielsen. *Antisense Nucl. Acids Drug Devel.*, **7**, 431 (1997)

27. P.E.Nielsen, M.Egholm, R.H.Berg, O.Buchardt. *Anti-Cancer Drug Design*, **8**, 53 (1993)
28. J.Wang, E.Palecek, P.E.Nielsen, G.Rivas, X.Cai, H.Shiraishi, N.Dontha, D.Luo, P.A.M.Farias. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7667 (1996)
29. T.J.Griffin, L.M.Smith. *Anal. Biochem.*, **260**, 56 (1998)
30. U.Giesen, W.Kleider, C.Berding, A.Geiger, H.Orum, P.E.Nielsen. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 5004 (1998)
31. D.Y.Cherny, B.P.Belotserkovskii, M.D.Frank-Kamenetskii, M.Egholm, O.Buchardt, R.H.Berg, P.E.Nielsen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1667 (1993)
32. P.E.Nielsen, M.Egholm, O.Buchardt. *J. Mol. Recognit.*, **7**, 165 (1994)
33. P.E.Nielsen. *Methods Enzymol.*, **340**, 329 (2001)
34. E.Ferrer, A.Shevchenko, R.Eritja. *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 291 (2000)
35. L.Betts, J.A.Josey, J.M.Veal, S.R.Jordan. *Science*, **270**, 1838 (1995)
36. R.Gambari. *Curr. Pharm. Des.*, **7**, 1839 (2001)
37. P.E.Nielsen, M.Egholm. *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 2429 (2001)
38. Ю.Н.Косаганов, Д.А.Стеценко, Е.Н.Лубяко, Н.П.Квитко, Ю.С.Лазуркин. *Мол. биол.*, **32**, 121 (1998)
39. M.Egholm, L.Christensen, K.Dueholm, O.Buchardt, J.Coull, P.E.Nielsen. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 217 (1995)
40. V.V.Demidov, M.V.Yavolovich, B.P.Belotserkovskii, M.D.Frank-Kamenetskii, P.E.Nielsen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2637 (1995)
41. P.Wittung, P.E.Nielsen, B.Norden. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7049 (1996)
42. V.V.Demidov, M.V.Yavolovich, M.D.Frank-Kamenetskii. *Biophys. J.*, **72**, 2763 (1997)
43. K.N.Ganesh. *Curr. Sci.*, **75**, 1346 (1998)
44. H.Kuhn, V.V.Demidov, P.E.Nielsen, M.D.Frank-Kamenetskii. *J. Mol. Biol.*, **286**, 1337 (1999)
45. M.C.Griffith, L.S.Risen, M.J.Greig, E.A.Lesnik, K.G.Sprinkle, R.H.Griffey, J.S.Kiely, S.M.Freier. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 831 (1995)
46. S.E.Hamilton, M.Iyer, J.C.Norton, D.R.Corey. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 2897 (1996)
47. B.M.Tyler-McMahon, J.A.Stewart, J.Jackson, M.D.Bitner, A.Fauq, D.J.McCormick, E.Richelson. *Biochem. Pharmacol.*, **62**, 929 (2001)
48. J.Micklefield. *Curr. Med. Chem.*, **7**, 3001 (1997)
49. T.Koch, M.Naesby, P.Wittung, M.Jørgensen, C.Larsson, O.Buchardt, C.J.Stanley, B.Norden, P.E.Nielsen, H.Ørum. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 6933 (1995)
50. C.G.Simmons, A.E.Pitts, L.D.Mayfield, J.W.Shay, D.R.Corey. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 3001 (1997)
51. M.Pooga, U.Sommets, M.Hallbrink, A.Valkna, K.Saar, K.Rezaci, U.Kahl, J.-X.Hao, Z.Wiesenfeld-Hallin, T.Hokfelt, T.Bartfai, U.Langel. *Nature Biotechnol.*, **16**, 857 (1998)
52. G.Aldrian-Herrada, M.G.Desarmenien, H.Orcel, L.Boissin-Agasse, J.Mery, J.Brigidou, A.Rabie. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 4910 (1998)
53. S.Basu, E.Wickstrom. *Bioconj. Chem.*, **8**, 481 (1997)
54. P.Garner, S.Dey, Y.Huang, X.Zhang. *Org. Lett.*, **1**, 403 (1999)
55. P.Garner, S.Dey, Y.Huang. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2405 (2000)
56. P.Garner, B.Sherry, S.Moilanen, Y.Huang. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2315 (2001)
57. P.E.Nielsen, M.Egholm. In *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications. Synthesis of PNA Oligomers by Fmoc Chemistry*. (Eds P.E.Nielsen, M.Egholm). Horizon Scientific Press, Wymondham, 1999. P. 1
58. P.E.Nielsen. *Antiviral News*, **1**, 37 (1993)
59. P.E.Nielsen, H.Orum. In *Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends*. (Eds A.M.Griffin, H.G.Griffin). Horizon Scientific Press, Wymondham, 1995. P. 73
60. M.Egholm, P.E.Nielsen, O.Buchardt, R.H.Berg. In *Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis. Peptides, Proteins and Nucleic Acids. Biological and Biomedical Applications*. (Ed. R.Epton). Mayflower Worldwide, Birmingham, 1994. P. 145
61. P.E.Nielsen. In *Perspectives in Drug Discovery and Design. Vol. 4*. ESCOM Science Publishers, 1995. P. 76
62. A.Ray, B.Norden. *FASEB J.*, **14**, 1041 (2000)
63. P.E.Nielsen. *Methods Enzymol.*, **313**, 156 (2000)
64. P.E.Nielsen. *Pharmacol. Toxicol.*, **86**, 3 (2000)
65. H.Knudsen, P.E.Nielsen. *Anti-Cancer Drugs*, **8**, 113 (1997)
66. P.E.Nielsen, M.Egholm, R.H.Berg, O.Buchardt. In *Antisense Research and Applications*. (Eds S.Crook, B.Lebau). CRC Press, Boca Raton, FL, 1993. P. 363
67. J.C.Hanvey, N.J.Peffer, J.E.Bisi, S.A.Thomson, R.Cadilla, J.A.Josey, D.J.Ricca, C.F.Hassman, M.A.Bonham, K.G.Au, S.G.Karter, D.A.Bruckenstein, A.L.Boyd, S.A.Noble, L.E.Babiss. *Science*, **258**, 1481 (1992)
68. P.E.Nielsen, M.Egholm, O.Buchardt. *Gene*, **149**, 139 (1994)
69. M.A.Bonham, S.Brown, A.L.Boyd, P.H.Brown, D.A.Bruckenstein, J.C.Hanvey, S.A.Thomson, A.Pipe, C.F.Hassman, J.E.Bisi, B.C.Froehler, M.D.Matteucci, R.W.Wagner, S.A.Noble, L.E.Babiss. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 1197 (1995)
70. P.E.Nielsen. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**, 167 (1995)
71. A.De Mesmaeker, K.-M.Altman, A.Waldner, S.Wendeborn. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 343 (1995)
72. H.J.Larsen, P.E.Nielsen. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 458 (1996)
73. H.Knudsen, P.E.Nielsen. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 494 (1996)
74. C.Gambacorti-Passerini, L.Mologni, C.Bertazzoli, E.Marchesi, F.Grignani, P.E.Nielsen. *Blood*, **88**, 1411 (1996)
75. T.A.Vickers, M.C.Griffith, K.Ramasamy, L.M.Risen, S.M.Freier. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 3003 (1995)
76. B.P.Casey, P.M.Glazer. *Prog. Nucl. Acid Res.*, **67**, 163 (2001)
77. F.Bergmann, W.Bannwarth, S.Tam. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 6823 (1995)
78. P.E.Nielsen. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**, 71 (1999)
79. G.Dieci, R.Corradini, S.Sforza, R.Marchelli, S.Ottoneello. *J. Biol. Chem.*, **276**, 5720 (2001)
80. A.Beletskii, Y.-K.Hong, J.Pehrson, M.Egholm, W.M.Strauss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9215 (2001)
81. C.Mischiati, M.Borgatti, N.Bianchi, C.Rutigliano, M.Tomassetti, G.Feriotto, R.Gambari. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33114 (1999)
82. H.S.Misra, P.K.Pandey, M.J.Modak, R.Vinayak, V.N.Pandey. *Biochemistry*, **37**, 1917 (1998)
83. J.Weiler, H.Gausepohl, N.Hauser, O.N.Jensen, J.D.Hoheisel. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 2792 (1997)
84. X.Liu, S.Balasubramanian. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 6153 (2000)
85. S.E.Hamilton, C.G.Simmons, I.S.Kathiriyai, D.R.Corey. *Chem. Biol.*, **6**, 343 (1999)
86. J.Lohse, P.E.Nielsen, N.Harrit, O.Dahl. *Bioconj. Chem.*, **8**, 503 (1997)
87. O.Seitz, F.Bergmann, D.Heindl. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **38**, 2203 (1999)
88. F.Lesignoli, A.Germini, R.Corradini, S.Sforza, G.Galaverna, A.Dossena, R.Marchelli. *J. Chrom. A*, **922**, 177 (2001)
89. T.J.Griffin, W.Tang, L.M.Smith. *Nat. Biotechnol.*, **15**, 1368 (1997)
90. C.Carlsson, M.Jonsson, B.Norden, M.T.Dulay, R.N.Zare, J.Noolandi, P.E.Nielsen, L.C.Tsui, J.Zielenski. *Nature (London)*, **380**, 260 (1996)
91. E.Palecek, M.Fojta, M.Tomschik, J.Wang. *J. Biosens. Bioelectron.*, **13**, 621 (1998)
92. J.Wang. *J. Biosens. Bioelectron.*, **13**, 757 (1998)
93. J.Wang, G.Rivas, X.Cai, M.Chicharro, C.Parrado, N.Dontha, A.Begleiter, M.Mowat, E.Palecek, P.E.Nielsen. *Anal. Chim. Acta*, **344**, 111 (1997)
94. L.Christensen, R.Fitzpatrick, B.Gildea, K.H.Petersen, H.F.Hansen, T.Koch, M.Egholm, O.Buchardt, P.E.Nielsen, J.Coull, R.H.Berg. *J. Pept. Sci.*, **3**, 175 (1995)
95. T.Koch, H.F.Hansen, P.Andersen, T.Larsen, H.G.Batz, K.Ottesen, H.Orum. *J. Pept. Res.*, **49**, 80 (1997)
96. D.W.Will, G.Breipohl, D.Langner, J.Knolle, E.Uhlmann. *Tetrahedron*, **51**, 12069 (1995)
97. S.A.Thomson, J.A.Josey, R.Cadilla, M.D.Gaul, C.F.Hassman, M.J.Luzzio, A.J.Pipe, K.L.Reed, D.J.Ricca, R.W.Wiethe, S.A.Noble. *Tetrahedron*, **51**, 6179 (1995)
98. R.B.Merrifield. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149 (1963)

99. K.L.Dueholm, M.Egholm, C.Behrens, L.Christensen, H.F.Hansen, T.Vulpus, K.H.Petersen, R.H.Berg, P.E.Nielsen, O.Buchardt. *J. Org. Chem.*, **59**, 5767 (1994)
100. L.Christensen, R.Fitzpatrick, B.Gildea, B.Warren, J.Coull. In *Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis. Peptides, Proteins and Nucleic Acids. Biological and Biomedical Applications.* (Ed. R.Epton). Mayflower Worldwide, Birmingham, 1994. P. 149
101. L.A.Carpino. *Acc. Chem. Res.*, **20**, 401 (1987)
102. P.Kocienski. *Protecting Groups*. Georg Thieme, Stuttgart, 1994
103. E.Sonveaux. In *Protocols for Oligonucleotides Conjugates, Methods in Molecular Biology. Vol. 26.* (Ed. S.Agrawal). Humana Press, Totowa, 1994. P. 1
104. Z.Timar, L.Kovacs, G.Kovacs, Z.Schmel. *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1*, 19 (2000)
105. M.Kuwahara, M.Arimitsu, M.Sisido. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 256 (1999)
106. R.Casale, I.S.Jensen, M.Egholm. In *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications. Synthesis of PNA Oligomers by Fmoc Chemistry.* (Eds P.E.Nielsen, M.Egholm). Horizon Scientific Press, Wymondham, 1999. P. 39
107. G.Breipohl, D.W.Will, A.Peyman, E.Uhlmann. *Tetrahedron*, **53**, 14671 (1997)
108. E.Uhlmann, D.W.Will, G.Breipohl, D.Langner, A.Ryte. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 2632 (1996)
109. A.C.van der Laan, R.Brill, R.G.Kuimelis, E.Kuyl-Yeheskiely, J.H.van Boom, A.Andrus, R.Vinayak. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 2249 (1997)
110. V.A.Efimov, M.V.Choob, A.A.Buryakova, O.G.Chakhmakheva. *Nucleosides Nucleotides*, **17**, 1671 (1998)
111. A.C.van der Laan, N.J.Meeuwenoord, E.Kuyl-Yeheskiely, R.S.Oosting, R.Brands, J.H.van Boom. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **114**, 295 (1995)
112. Д.А.Стеценко, С.В.Веселовская, Е.Н.Лубяко, В.К.Потапов, Т.Л.Ажикина, Е.Д.Свердлов. *Докл. АН*, **338**, 695 (1994)
113. G.Aldrian-Herrada, A.Rabie, R.Winersteiger, J.Brugidou. *J. Pept. Sci.*, **4**, 266 (1998)
114. G.Breipohl, J.Knolle, D.Langner, G.Omalley, E.Uhlmann. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 665 (1996)
115. G.Kovacs, Z.Timar, Z.Kele, L.Kovacs. In *The Fourth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-4)*. 2000. P. B0003. [www.mdpi.org/ecsoc-4.htm](http://www.mdpi.org/ecsoc-4.htm)
116. V.A.Efimov, M.V.Choob, A.A.Buryakova, A.L.Kalinkina, O.G.Chakhmakheva. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 566 (1998)
117. M.Eriksson, L.Christensen, J.Schmidt, G.Haaima, L.Orgel, P.E.Nielsen. *New J. Chem.*, **22**, 1055 (1998)
118. B.Due Larsen, C.Larsen, A.Holm. In *Peptides 1990, Proceedings of the 21st European Peptide Symposium.* (Eds E.Giralt, D.Andreu). ESCOM, Leiden, 1991. P. 183
119. E.Bayer, C.Goldammer. In *Peptides, Proceedings of the 12th American Peptide Symposium.* (Eds J.A.Smith, J.E.Rivier). ESCOM, Leiden, 1992. P. 589
120. S.M.Meister, S.B.H.Kent. In *Peptides — Structure and Function: Proceedings of the Eighth American Peptide Symposium.* (Eds V.J.Hruby, D.H.Rich). Pierce Chem., Rockford, IL, 1984. P. 103
121. C.Mapelli, M.D.Sverdloff. In *Peptides 1990, Proceedings of the 21st European Peptide Symposium.* (Eds E.Giralt, D.Andreu). ESCOM, Leiden, 1991. P. 316
122. D.Le-Nguyen, A.Heitz, B.Castro. *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1*, 1915 (1987)
123. M.Schnolzer, P.Alewood, A.Jones, D.Alewood, S.B.H.Kent. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **40**, 180 (1992)
124. J.P.Briand, J.Coste, A.Van Dorsselaer, B.Raboy, J.Nemark, B.Castro, S.Muller. In *Peptides 1990, Proceedings of the 21st European Peptide Symposium.* (Ed. E.Giralt, D.Andreu). ESCOM, Leiden, 1991. P. 80
125. M.Schnolzer, P.Alewood, A.Jones, S.B.H.Kent. In *Peptides, Proceedings of the 12th American Peptide Symposium.* (Eds J.A.Smith, J.E.Rivier). ESCOM, Leiden, 1992. P. 623
126. J.Jezek, R.A.Houghten. In *Peptides 1990, Proceedings of the 21st European Peptide Symposium.* (Eds E.Giralt, D.Andreu). ESCOM, Leiden, 1990. P. 74
127. G.E.Reid, R.J.Simpson. *Anal. Biochem.*, **200**, 301 (1992)
128. G.B.Fields. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4202 (1991)
129. S.Scarfi, A.Gasparini, G.Damonte, U.Benatti. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 323 (1997)
130. J.P.Tam, W.F.Heath, R.B.Merrifield. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5242 (1986)
131. G.Haaima, A.Lohse, O.Buchardt, P.E.Nielsen. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 1939 (1996)
132. A.Püschel, S.Sforza, G.Haaima, O.Dahl, P.E.Nielsen. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 4707 (1998)
133. B.Armitage, D.Ly, T.Koch, H.Frydenlund, H.Orum, G.B.Schuster. *Biochemistry*, **37**, 9417 (1998)
134. N.Svanvik, G.Westman, D.Wang, M.Kubista. *Anal. Biochem.*, **281**, 26 (2000)
135. S.Sforza, R.Corradini, S.Ghirardi, A.Dossena, R.Marchelli. *Eur. J. Org. Chem.*, 2905 (2000)
136. S.Sforza, G.Haaima, R.Marchelli, P.E.Nielsen. *Eur. J. Org. Chem.*, 197 (1999)
137. A.Lenzi, G.Reginato, M.Taddei, E.Trifileff. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1717 (1995)
138. H.Gausepohl, U.Pieles, R.W.Frank. In *Peptides, Proceedings of the 12th American Peptide Symposium.* (Eds J.A.Smith, J.E.Rivier). ESCOM, Leiden, 1992. P. 523
139. D.R.Corey. *Trends Biotechnol.*, **15**, 224 (1997)
140. J.Norton, J.H.Waggenspack, E.Varnum, D.R.Corey. *Bioorg. Med. Chem.*, **3**, 437 (1995)
141. L.D.Mayfield, D.R.Corey. *Anal. Biochem.*, **268**, 401 (1999)
142. M.Quibell, T.Johnson, W.G.Turnell. *Biomed. Pep. Protein Nucl. Acids*, **1**, (1994-1995)
143. E.Atherton. In *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. (Practical Approach Series).* (Eds E.Atherton, R.C.Sheppard). Oxford University Press, Oxford, 1989. P. 117
144. D.A.Stetsenko, E.N.Lubyako, V.K.Potapov, T.L.Azhikina, E.D.Sverdlov. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 3571 (1996)
145. Д.А.Стеценко, Е.Н.Лубяко, В.К.Потапов, Т.Л.Ажикина, Е.Д.Свердлов. *Докл. АН*, **343**, 834 (1995)
146. A.C.van der Laan, R.Strömberg, J.H.van Boom, E.Kuyl-Yeheskiely, V.A.Efimov, O.G.Chakhmakheva. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 7857 (1996)
147. V.A.Efimov, M.V.Choob, A.L.Kalinkina, O.G.Chakhmakheva, R.Strömberg, A.C.van der Laan, N.J.Meeuwenoord, E.Kuyl-Yeheskiely, J.H.van Boom. *Collect. Czech. Chem. Commun. (Spec. Issue)*, **61**, 262 (1996)
148. K.H.Petersen, D.K.Jensen, M.Egholm, P.E.Nielsen, O.Buchardt. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **5**, 1119 (1995)
149. P.J.Finn, N.L.Gibson, R.Fallon, A.Hamilton, T.Brown. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3357 (1996)
150. R.Vinayak, A.C.van der Laan, R.Brill, K.Otteson, A.Andrus, E.Kuyl-Yeheskiely, J.H.van Boom. *Nucleosides Nucleotides*, **16**, 1653 (1997)
151. L.D.Mayfield, D.R.Corey. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1419 (1999)
152. F.Bergmann, W.Bannwarth. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1839 (1995)
153. J.Coste, M.-N.Dufour, A.Pantaloni, B.Castro. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 669 (1990)

**PEPTIDE NUCLEIC ACIDS: STRUCTURE, PROPERTIES, APPLICATIONS, STRATEGIES AND PRACTICE OF CHEMICAL SYNTHESIS****S.I.Antsypovich***Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University  
Leninskie Gory, 119899 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)939–3181*

The information on the structure and properties of peptide nucleic acids (PNA) is presented. Examples of applications of PNA oligomers for biomolecular investigations and for biotechnology are given. Published data on the most important methods of chemical synthesis of PNA oligomers are summarised, the attention is focused on the problems concerned with performance of PNA coupling. The systematisation of PNA synthetic strategies is accomplished, their advantages and drawbacks are discussed. The recommendations for optimisation of the PNA coupling reaction and the whole chemical synthesis of PNA oligomers are formulated.

Bibliography — 153 references.

*Received 11th July 2001*