



УДК 577.113.4

РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ МЕТИЛФОСФОНАТНЫЕ  
ГРУППЫII \*. СИНТЕЗ СТЕРЕОРЕГУЛЯРНЫХ ОКТАИМИДИЛАТОВ,  
СОДЕРЖАЩИХ АЛКИЛИРУЮЩИЙ ОСТАТОК  
4-(N-МЕТИЛАМИНО-N-2-ХЛОРЭТИЛ)БЕНЗИЛАМИНА  
И ЧЕРЕДУЮЩИЕСЯ МЕТИЛФОСФОНАТНЫЕ ОСТАТКИ*Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф.**Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Получены алкилирующие стереорегулярные олиготимидилатные реагенты, содержащие остаток азотистого нуклеотида и имеющие метилфосфонатные остатки. Исходные метилфосфонатные производные олиготимидилатов сконструированы таким образом, что позволяют легко вводить реакционные группировки как по 5'-, так и по 3'-концам олигонуклеотида.

Известно, что метилфосфонатные аналоги олигонуклеотидов (МФАО) находят широкое применение как ингибиторы экспрессии генов [3–5]. Воздействие этих аналогов олигонуклеотидов на генетический аппарат клетки обусловлено их способностью образовывать комплементарные комплексы с определенной последовательностью НК-мишени [4, 6, 7]. Это стимулировало разработку методов синтеза таких производных как в обычном [4, 6–9], так и в твердофазном [10–12] вариантах. Представляется перспективным использовать МФАО в сочетании с модифицирующими группировками, способными реагировать с НК с образованием ковалентных связей. Реагенты такого типа должны обладать рядом преимуществ по сравнению с реагентами на основе природных олигонуклеотидов. Они, как и исходные МФАО, должны быть более устойчивыми к действию клеточных нуклеаз и в силу повышенной гидрофобности лучше проникать через клеточные мембраны.

Отличительной особенностью МФАО является наличие в последних хиральных метилфосфонатных центров, приводящих к образованию диастереомеров. Известно, что индивидуальные диастереомеры МФАО по-разному себя проявляют при взаимодействиях НК–НК [6, 13] и НК–белок [14]. Поэтому изучение свойств алкилирующих производных МФАО целесообразно проводить на основе стереорегулярных последовательностей с известной конфигурацией заместителей при атоме фосфора в метилфосфонатном фрагменте олигонуклеотида.

Целью данной работы является синтез стереорегулярных аналогов олиготимидилатов, имеющих метилфосфорные группировки с известной абсолютной конфигурацией и одновременно содержащих по 3'- или 5'-концевому фосфату остаток 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензиламина.

На первом этапе работы, исходя из ранее описанных полностью за-

\* Сообщение I см. [1]. Сокращения:  $(\text{MeO})_2\text{Tr}$  – *n,n'*-диметокситритил, CNEt – 2-цианэтил, TPS – 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, MeIm – N-метилимидазол, Py – пиридин,  $(\text{PyS})_2$  – 2,2'-дипиридилдисульфид,  $\text{Ph}_3\text{P}$  – трифенилфосфин,  $-\text{pNHCH}_2\text{RCl}$  – 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилфосфамидный остаток, НК – нуклеиновая кислота;  $\underline{p}$  – метилфосфонатный остаток в нуклеотидах,  $\underline{p}'$  и  $\underline{p}''$  – относятся к  $R_p$ - и  $S_p$ -энантиомерным конфигурациям при атоме фосфора в метилфосфонатном фрагменте  $\text{Tr}'\text{T}$  или  $\text{Tr}''\text{T}$  [1, 2], штрих и два штриха указывают на порядок элюции соответствующих защищенных производных при хроматографии на силикагеле; МФАО – метилфосфонатные аналоги олигонуклеотидов.



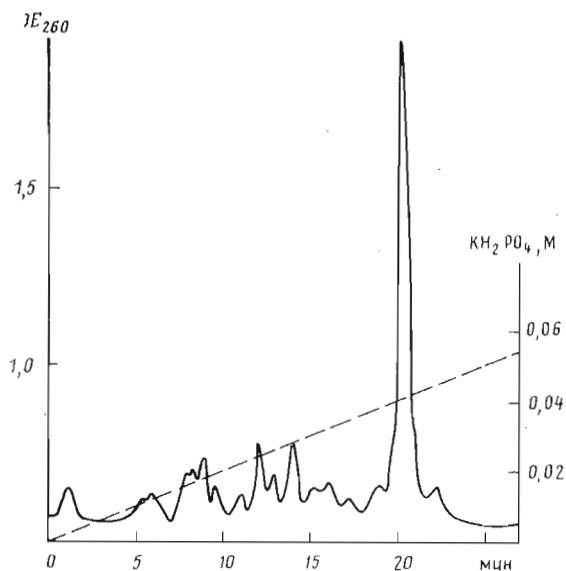


Рис. 1. Ионообменная ВЭЖХ реакционной смеси, полученной при синтезе октатимидилата  $\text{Tr}(\text{TrTr}')_3\text{TrSCH}_3$  (IVa), в градиенте концентрации  $\text{K}_2\text{PO}_4$  (рН 6,5) в 30% ацетонитриле. Колонка  $10 \times 250$  мм. Скорость элюции 6 мл/мин

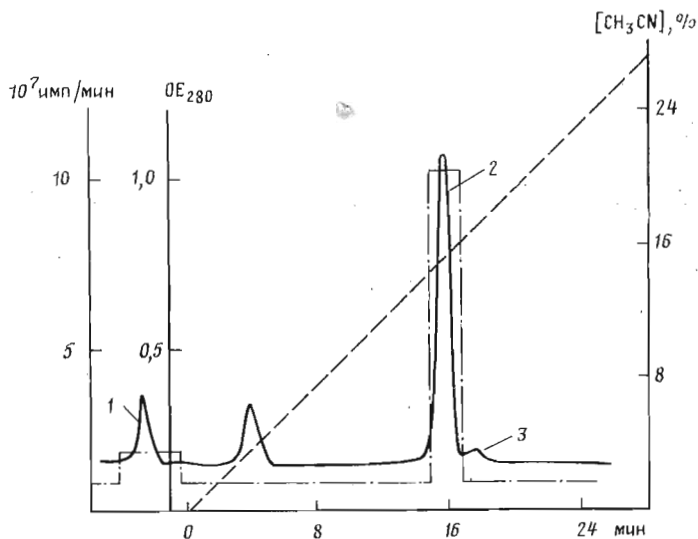


Рис. 2. Обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционной смеси, содержащей: 1 —  $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 2 —  $5'$ - $^{32}\text{P}$ -меченый октатимидилат  $\text{pTr}(\text{TrTr}')_3\text{TrSCH}_3$ , 3 — исходный олигонуклеотид  $\text{Tr}(\text{TrTr}')_3\text{TrSCH}_3$ , в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,05 М  $\text{LiClO}_4$ . Колонка  $4 \times 250$  мм. Скорость элюции 3 мл/мин. Сплошной линией показан профиль элюции по УФ-поглощению, штрихпунктирной — по уровню радиоактивности

щищенных динуклеотидных блоков [1]  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{Tr}(\text{SCH}_3)\text{Tr}(\text{SCH}_3, \text{CNEt})$  (I),  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{TrTr}(\text{SCH}_3, \text{CNEt})$  (II),  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{Tr}'\text{Tr}(\text{SCH}_3, \text{CNEt})$  (IIa) или  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{Tr}''\text{Tr}(\text{SCH}_3, \text{CNEt})$  (IIб), в присутствии TPS и  $\text{MeIm}$  [15] (см., например, схему 1) были получены четыре октатимидилатные последовательности:  $(\text{Tr})_7\text{TrSCH}_3$  (III),  $\text{Tr}(\text{TrTr})_3\text{TrSCH}_3$  (IV),  $\text{Tr}(\text{TrTr}')_3\text{TrSCH}_3$  (IVa) и  $\text{Tr}(\text{TrTr}'')_3\text{TrSCH}_3$  (IVб). Выходы продуктов конденсации на стадию в среднем составляли 70–80%. Удаление межнуклеотидных защитных  $\text{CH}_3\text{S}$ -групп проводили в мягких щелочных

**Относительные времена удерживания октатимидилатных производных при обращенно-фазовой ( $T_{\text{отн}}$ ) и ионообменной ( $T'_{\text{отн}}$ ) хроматографии**

Номер п.п.	Продукты	$T_i/T_j^*$	$T_{\text{отн}}^{**}$	$T'_{\text{отн}}^{***}$
	Исходные октатимидилаты			
1	(Tr) <sub>7</sub> TrpSCH <sub>3</sub> (III)	$T_1/T_1$	1,00	1,00
2	Tr(TrTr) <sub>3</sub> TrpSCH <sub>3</sub> (IV)	$T_2/T_1$	1,33	0,30
3	Tr(TrTr') <sub>3</sub> TrpSCH <sub>3</sub> (IVa)	$T_3/T_1$	1,33	0,29
4	Tr(TrTr'') <sub>3</sub> TrpSCH <sub>3</sub> (IVб)	$T_4/T_1$	1,33	0,29
	5'-Фосфорилированные октатимидилаты			
5	p(Tr) <sub>7</sub> TrpSCH <sub>3</sub> (XI)	$T_5/T_1$	0,92	—
6	pTr(TrTr) <sub>3</sub> TrpSCH <sub>3</sub> (X)	$T_6/T_2$	0,92	—
7	pTr(TrTr') <sub>3</sub> TrpSCH <sub>3</sub> (Xa)	$T_7/T_3$	0,91	—
8	pTr(TrTr'') <sub>3</sub> TrpSCH <sub>3</sub> (Xб)	$T_8/T_4$	0,91	—
	Октатимидилаты с 3'-фосфатом			
9	(Tr) <sub>7</sub> Tr (XII)	$T_9/T_1$	0,85	—
10	Tr(TrTr) <sub>3</sub> Tr (XIII)	$T_{10}/T_2$	0,93	—
11	Tr(TrTr') <sub>3</sub> Tr (XIIIa)	$T_{11}/T_3$	0,91	—
12	Tr(TrTr'') <sub>3</sub> Tr (XIIIб)	$T_{12}/T_4$	0,92	—
	5'-Фосфамидные реагенты			
13	CIRCH <sub>2</sub> NHр(Tr) <sub>7</sub> TrpSCH <sub>3</sub> (XVI)	$T_{13}/T_5$	1,28	—
14	CIRCH <sub>2</sub> NHрTr(TrTr) <sub>3</sub> TrpSCH <sub>3</sub> (XVII)	$T_{14}/T_6$	1,25	—
15	CIRCH <sub>2</sub> NHрTr(TrTr') <sub>3</sub> TrpSCH <sub>3</sub> (XVIIa)	$T_{15}/T_7$	1,24	—
16	CIRCH <sub>2</sub> NHрTr(TrTr'') <sub>3</sub> TrpSCH <sub>3</sub> (XVIIб)	$T_{16}/T_8$	1,23	—
	3'-Фосфамидные реагенты			
17	(Tr) <sub>7</sub> TrpNHCH <sub>2</sub> RCl (XIV)	$T_{17}/T_9$	1,23	—
18	Tr(TrTr) <sub>3</sub> TrpNHCH <sub>2</sub> RCl (XV)	$T_{18}/T_{10}$	1,21	—
19	Tr(TrTr') <sub>3</sub> TrpNHCH <sub>2</sub> RCl (XVa)	$T_{19}/T_{11}$	1,22	—
20	Tr(TrTr'') <sub>3</sub> TrpNHCH <sub>2</sub> RCl (XVб)	$T_{20}/T_{12}$	1,22	—

\*  $T_i/T_j$  — отношение времен удерживания полученных соединений, имеющих в таблице соответственно  $i$ -й и  $j$ -й порядковый номера.

\*\* Значения  $T_{\text{отн}}$  и  $T'_{\text{отн}}$  измерены с точностью  $\pm 0,01$ .

условиях с целью предотвращения гидролиза метилфосфонатных связей. На рис. 1 представлен типичный профиль ионообменной хроматографии реакционной смеси по окончании синтеза и деблокирования защитных групп. Относительные времена удерживания выделенных и очищенных обращенно-фазовой хроматографией производных представлены в таблице. Соединения (IVa) и (IVб), полученные из индивидуальных изомеров динуклеотида (II), содержат метилфосфонатные остатки  $R_p$ - либо  $S_p$ -конфигурации соответственно. Соединение (IV) представляет собой смесь 8 диастереомеров, так как исходно были использованы динуклеотидные блоки, не разделенные на диастереомеры.

Все полученные аналоги на 3'-конце имеют рSCH<sub>3</sub>-группу, а на 5'-конце — две фосфодиэфирные межнуклеотидные группировки. Согласно данным работы [16], наличие по крайней мере одной фосфодиэфирной группировки на 5'-конце олигонуклеотида необходимо для его фосфорилирования с помощью Т4-полинуклеотидкиназы.

Фосфорилирование полученных соединений (IV), (IVa) и (IVб) было осуществлено в препаративном масштабе в присутствии [<sup>32</sup>P]АТР и Т4-полинуклеотидкиназы [17]. Полученные аналоги рTr(TrTr)<sub>3</sub>TrpSCH<sub>3</sub> (X), рTr(TrTr')<sub>3</sub>TrpSCH<sub>3</sub> (Xa), рTr(TrTr'')<sub>3</sub>TrpSCH<sub>3</sub> (Xб) и р(Tr)<sub>7</sub>TrpSCH<sub>3</sub> (XI) содержат 5'-концевую <sup>32</sup>P-высокомеченую фосфатную группу, необходимую для получения алкилирующих реагентов с высокой удельной активностью. По данным хроматографии (рис. 2), в октатимидилаты вводится до 84% <sup>32</sup>P-метки исходной [<sup>32</sup>P]АТР.

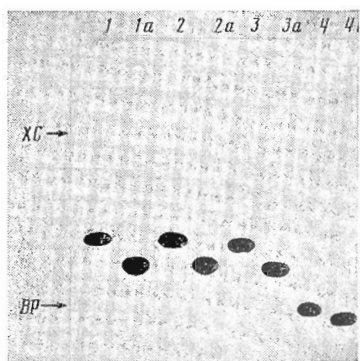


Рис. 3

Рис. 3. Электрофоретический анализ в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины,  $5'$ - $^{32}\text{P}$ -меченных октатимидилатных производных (X), (Xa), (Xб), (XI) (дорожки 1–4 соответственно) и их же после удаления  $3'$ -концевой S-метильной группы (дорожки 1a–4a соответственно). Показано положение маркерных красителей кселенцианола (XC) и бромфенолового синего (BP)

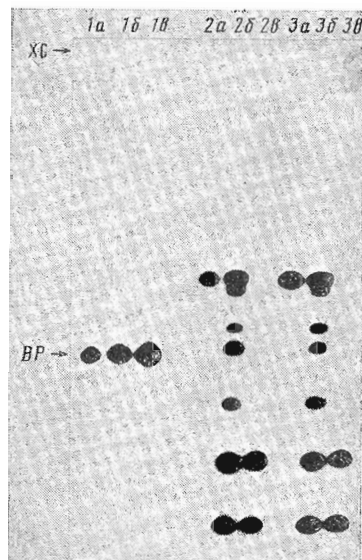


Рис. 4

Рис. 4. Электрофорез в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины, октатимидилатов  $\text{p}(\text{Tr})_7\text{TrSCH}_3$  (1a),  $\text{pTr}(\text{TrTr})_3\text{TrSCH}_3$  (2a) и  $\text{pTr}(\text{TrTrTr})_3\text{TrSCH}_3$  (3a). Соответствующие олигонуклеотиды, обработанные 25% аммиаком при  $70^\circ\text{C}$  в течение 2 ч (дорожки 1б, 2б, 3б) и 24 ч (дорожки 1в, 2в, 3в)

Наличие радиоактивной метки позволяет получить дополнительные сведения о структуре синтезированных аналогов. Их гомогенность подтверждена данными анализа электрофорезом в 20% ПААГ (рис. 3). Присутствие метилфосфатных группировок в октатимидилатах доказано частичным и полным щелочным гидролизом метилфосфонатных связей [4] (рис. 4). Известно, что в жестких щелочных условиях эти связи расщепляются с образованием смеси  $3'$ - и  $5'$ -метилфосфонатных продуктов [4]. В нашем случае при полном щелочном гидролизе наблюдается, как и следовало ожидать, образование  $^{32}\text{P}$ -меченных  $\text{pTrTrTr}$  и  $\text{rTrTrTr}$  (рис. 4, дорожки 2в, 3в). При анализе продуктов частичного гидролиза соединений  $\text{pTr}(\text{TrTr})_3\text{TrSCH}_3$  (X),  $\text{pTr}(\text{TrTr}')_3\text{TrSCH}_3$  (Xa) и  $\text{pTr}(\text{TrTr}'')_3\text{TrSCH}_3$  (Xб) дополнительно регистрируется еще четыре более длинных, чем тритимидилаты, последовательности (например, рис. 4, дорожки 2б, 3б). Из данных этого же рисунка видно, что контрольный октатимидилат  $\text{p}(\text{Tr})_7\text{TrSCH}_3$  (XI), не содержащий метилфосфонатных групп, в этих условиях щелочному гидролизу не подвергается (рис. 4, дорожки 1б, 1в). Сумма полученных данных полностью согласуется со структурой полученных соединений.

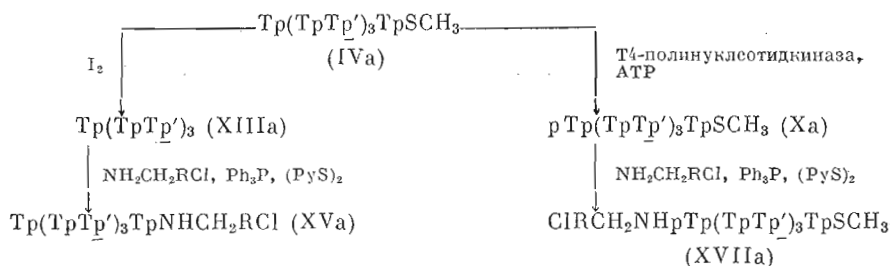
Наличие S-метильной  $3'$ -концевой защиты в этих октатимидилатах дополнительно подтверждено данными попообменной микроколониной и обращенно-фазовой хроматографии, а также гель-электрофореза (рис. 3). После удаления S-метильной группы обработкой соответствующих соединений (X), (Xa), (Xб) и (XI) иодом [18] были получены производные октатимидилатов, содержащие одновременно и  $5'$ - и  $3'$ -концевые фосфатные группы. При обработке в этих условиях аналогов (III), (IV), (IVa) и (IVб) получены производные  $(\text{Tr})_7\text{Tr}$  (XII),  $\text{Tr}(\text{TrTr})_3\text{Tr}$  (XIII),  $\text{Tr}(\text{TrTr}')_3\text{Tr}$  (XIIIa) и  $\text{Tr}(\text{TrTr}'')_3\text{Tr}$  (XIIIб), имеющие лишь  $3'$ -фосфатные группы.

Таким образом, используя селективно удаляемую 3'-S-метильную Р-блокирующую группу, нам удалось разработать достаточно простой способ получения ряда метилфосфонатных аналогов, в том числе и их индивидуальных диастереомеров, имеющих свободные концевые фосфатные группы. Такие производные пригодны для введения по 3'- или по 5'-концу олигонуклеотида (или одновременно по обоим концам) различных группировок.

Полученные аналоги были использованы для синтеза как 3'- (XIV), (XV), (XVa) и (XVб), так и 5'- (XVI), (XVII), (XVIIa) и (XVIIб) фосфамидных алкилирующих производных:  $(\text{Tp})_7\text{TpNHCH}_2\text{RCl}$  (XIV),  $\text{ClRCH}_2\text{HNp}(\text{Tp})_7\text{TpSCH}_3$  (XVI),  $\text{Tp}(\text{TpTp})_3\text{TpNHCH}_2\text{RCl}$  (XV),  $\text{ClRCH}_2\cdot\text{HNpTp}(\text{TpTp})_3\text{TpSCH}_3$  (XVII),  $\text{Tp}(\text{TpTp}')_3\text{TpNHCH}_2\text{RCl}$  (XVa),  $\text{ClRCH}_2\cdot\text{HNpTp}(\text{TpTp}')_3\text{TpSCH}_3$  (XVIIa),  $\text{Tp}(\text{TpTp}'')_3\text{TpNHCH}_2\text{RCl}$  (XVб),  $\text{ClRCH}_2\text{HNpTp}(\text{TpTp}'')_3\text{TpSCH}_3$  (XVIIб).

Введение 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензиламина в аналоги олиготимидилатов осуществлено по схеме 2 в присутствии трифенилфосфина, дипиридилдисульфида и MeIm, как описано в работе [19], с выходом 80–90%.

Схема 2



Типичный профиль препаративной обращенно-фазовой хроматографии при выделении целевого продукта приведен на рис. 5. Относительные времена удерживания синтезированных алкилирующих соединений приведены в таблице. Поскольку полученные алкилирующие производные по сравнению с исходными аналогами олигонуклеотидов имеют дополнительный гидрофобный 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензилфосфамидный остаток, полученные продукты обладают большим временем удерживания при обращенно-фазовой хроматографии. Гомогенность выделенных препаративной хроматографией продуктов была проверена аналитической обращенно-фазовой хроматографией. Типичный профиль такого анализа приведен на рис. 6а. Реакционную способность к алкилированию полученных производных олиготимидилатов проверяли по реакции с тиосульфатом [20] (рис. 6б). Реакция алкилирования тиосульфата протекала во всех случаях с почти количественным выходом (не ниже 95%).

Как видно из схемы 2, оба типа алкилирующих производных (3'- и 5'-) могут быть получены из одного олигонуклеотида с селективно деблокируемой S-метильной защитной группой.

Одной из важных характеристик полученных нами соединений является их способность образовывать комплементарные комплексы.

Было найдено, что температура плавления комплексов соединения (III), (IV), (IVa) или (IVб) с олигонуклеотидом  $d(\text{C}_5\text{A}_8\text{C}_5)$ , содержащим фрагмент октаденилата, составляет 15, 12, 20 и  $<3^\circ\text{C}$  соответственно. Отсюда следует, что один из диастереомеров — (IVa), синтезированный из динуклеотидного блока с  $R_p$ -конфигурацией метилфосфонатного остатка, способен образовывать комплементарный комплекс повышенной стабильности. Изомер (IVб), полученный из динуклеотидного блока  $S_p$ -конфигурации, образует комплекс лишь при низкой температуре. Полученные данные свидетельствуют о том, что стабильность комплементарных комплексов, образованных метилфосфонатными аналогами, определяется наличием  $\text{CH}_3$ -групп и конфигурацией атома фосфора. Это хорошо коррелирует с:

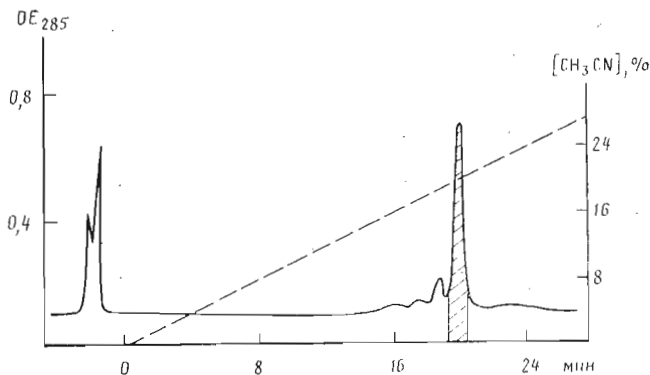


Рис. 5. Препаративная обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционной смеси при синтезе  $\text{C1RCH}_2\text{NHrTr}(\text{TrTr}')_3\text{TrSCH}_3$  (XVIIa) (заштрихованный участок) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,05 М  $\text{LiClO}_4$ . Колонка  $4 \times 250$  мм. Скорость элюции 3 мл/мин

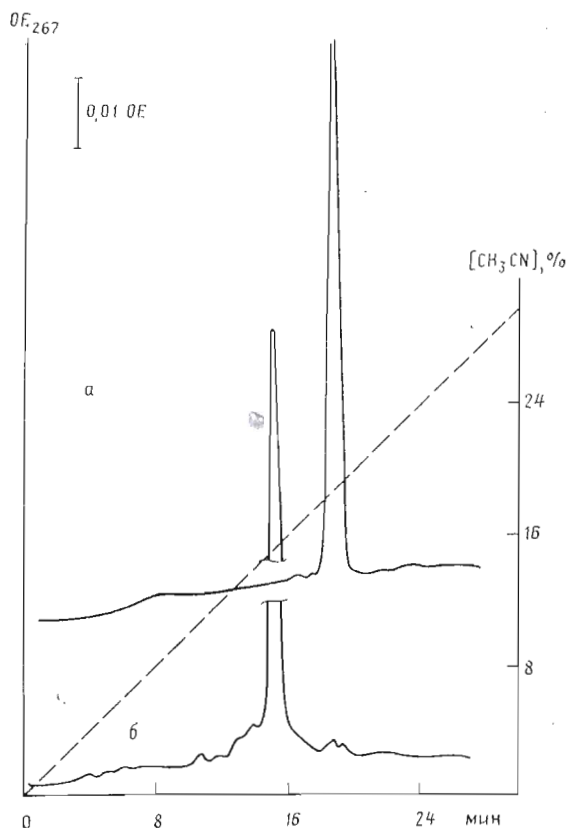


Рис. 6. Аналитическая обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционной смеси, содержащей алкилирующий нуклеотид  $\text{C1RCH}_2\text{NHrTr}(\text{TrTr}')_3\text{TrSCH}_3$  (XVIIa): а – исходный алкилирующий октануклеотид после выделения из реакционной смеси (рис. 5); б – он же после обработки 2 М  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ( $70^\circ\text{C}$ , 1 ч). Колонка  $4 \times 250$  мм. Скорость элюции 3 мл/мин

ранее полученными данными по стабильности комплементарных комплексов, образованных соответствующими  $p'$ - и  $p''$ -изомерами метилфосфонатных производных дека- и додекатимидилатов [6, 13].

Результаты по аффинной модификации НК-мишени реагентами (XIV) – (XVII) будут представлены в следующем сообщении.

Авторы выражают благодарность В. В. Горну за синтез октадекаде-

### Экспериментальная часть

В работе использованы гидрохлорид 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)-бензиламина, 2, 4, 6-триизопропилбензолсульфохлорид (опытное химическое производство НИОХ СО АН СССР), N-метилимидазол (Serva, ФРГ), трифенилфосфин (Chemapol, ЧССР), 2,2'-дипиридилдисульфид (Sigma, США),  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (3000 Ки/ммоль), Т5-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78; НИКТИ БАВ, Бердск).

Хроматографию осуществляли на силикагеле 40/100 мкм (Chemapol, ЧССР), ионообменную — на смоле Partisil 10 SAX (Whatman, Англия), обращенно-фазовую — на смоле Lichrosorb RP18 (Merck, ФРГ), ВЭЖХ — с использованием хроматографов Waters (США), ТСХ — на пластинках Kieselgel F 60 254 (Merck, ФРГ).

Плавление комплексов октадекадезоксинуклеотида  $d(C_5A_8C_5)$  с октатимидилатами (III), (IV), (IVa) и (IVб) осуществляли в 0,01 М трис-НСI-буфере (рН 7,4), содержащем 0,2 М NaCl, 0,01 М  $MgCl_2$  [24]. Концентрация комплексов  $1 \cdot 10^{-5}$  М. Синтез и основные характеристики исходных динуклеотидных блоков описаны ранее [4].

$[(MeO)_2Tr][Tp(SCH_3)]_2Tp(SCH_3, CNEt)$  был синтезирован исходя из полностью защищенного динуклеотида (I) по методу [15] с использованием в качестве конденсирующего реагента смеси TPS и MeIm [22, 23].

$[(MeO)_2Tr]Tp(SCH_3)[T(SCH_3)Tp']_3Tp(SCH_3, CNEt)$  получали последовательной конденсацией соответствующих защищенных ди- и тетра-нуклеотидных блоков (см. схему 1) в присутствии TPS и MeIm в пиридине. Выходы продуктов конденсаций (V) с (VIa), (VIIa) с (VIa) и (VIIIa) с (IXa) составляли соответственно 90, 88 и 79% при времени реакции 25, 25 и 40 мин соответственно (20° С). Нуклеотидный (0,1 М) и нуклеозидный компоненты, TPS с MeIm использовали в соотношении 1:0,9:3:9.

Аналогично были синтезированы полностью защищенные октатимидилатные производные  $[(MeO)_2Tr]Tp(SCH_3)[Tp(SCH_3)Tp']_3Tp(SCH_3, CNEt)$  и  $[(MeO)_2Tr]Tp(SCH_3)[Tp(SCH_3)Tp]_3Tp(SCH_3, CNEt)$ .

$Tp(TpTp')_3TpSCH_3$  (IVa),  $Tp(TpTp'')_3TpSCH_3$  (IVб),  $Tp(TpTp)_3TpSCH_3$  (IV) и  $(Tp)_7TpSCH_3$  (III). Полностью защищенный октатимидилат  $[(MeO)_2Tr]Tp(SCH_3)[Tp(SCH_3)Tp']_3Tp(SCH_3, CNEt)$  (15 мг) обрабатывали смесью пиридин — 25% водный аммиак, 1:1, при 20° С 48 ч, упаривали, обрабатывали 80% уксусной кислотой для удаления диметокситритильной защитной группы [6] (20° С, 30 мин), упаривали, растворяли в воде и проводили анионообменную хроматографию (рис. 1). Фракции вещества с наибольшим временем удерживания (основной продукт) собирали, упаривали и проводили обращенно-фазовую хроматографию (градиент концентрации (0—40%) ацетонитрила в 0,05 М водном  $LiClO_4$ ). Фракцию, содержащую продукт (IVa), упаривали, растворяли в 300 мкл смеси вода — ацетон, 1:2, и выпаривали в 1 мл 2% раствора  $LiClO_4$  в ацетоне. Осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном и высушивали. Получено 112 ОЕ<sub>260</sub> (IVa). Аналогично, исходя из 30 мг  $[(MeO)_2Tr]Tp \cdot (SCH_3)[Tp(SCH_3)Tp']_3Tp(SCH_3, CNEt)$ , 15 мг  $[(MeO)_2Tr]Tp(SCH_3) \cdot [Tp(SCH_3)Tp]_3Tp(SCH_3, CNEt)$  и 15 мг  $[(MeO)_2Tr][Tp(SCH_3)]_7Tp(SCH_3, CNEt)$  были получены соответственно 234 ОЕ<sub>260</sub> (IVб), 120 ОЕ<sub>260</sub> (IV) и 117 ОЕ<sub>260</sub> (III). Относительные времена удерживания полученных соединений приведены в таблице.

*Препаративное фосфорилирование октатимидилатов.* Фосфорилирование в радиоактивном варианте проводили в 150—500 мкл реакционной смеси, содержащей 0,05 М трис-НСI (рН 9,6), 0,01 М  $MgSO_4$ , 5 мМ дитиотреит, 20 мкм спермидин, 0,1 мМ EDTA [17], 50—150 нмоль олиготимидилата, 0,8—2,5 нмоль  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  и 12—36 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы (30 мин, 37° С). Затем добавили 30—100 нмоль нерадиоактивного АТР



(30 мин, 37° С), а затем еще 200–600 нмоль АТР (3–4 ч, 37° С). Фосфорилированный продукт выделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 2). Конечный выход фосфорилированного продукта 85–90%. Степень включения радиоактивного фосфора из реакционной смеси 80–84%.

Фосфорилирование с помощью нерадиоактивного АТР проводили аналогично, используя однократное добавление АТР (200–600 нмоль на 50–150 нмоль олиготимидилата) (2–3 ч, 37° С). Выходы конечного продукта 85–90%.

$Tr(TrTr')_3Tr$  (XIIIa),  $Tr(TrTr'')_3Tr$  (XIIIб),  $Tr(TrTr)_3Tr$  (XIII) и  $(Tr)_3$  (XII). 20 ОЕ<sub>260</sub> (IVa) обрабатывали 30 мин при 20° С 3 мл раствора, содержащего 20 мг пода в 2 мл смеси пиридин – вода, 3:2 [18], и 1 мл уксусной кислоты. Иод удаляли 3–4-кратной экстракцией хлороформом. Продукт (XIIIa) (17 ОЕ<sub>260</sub>) выделяли обращенно-фазовой хроматографией. Аналогично из (IVб), (IV) и (III) были получены соответственно соединения (XIIIб), (XIII) и (XII). Хроматографические характеристики полученных соединений приведены в таблице.

Аналогичным образом были получены <sup>32</sup>P-меченые продукты рTr·(TrTr')<sub>3</sub>Tr, рTr(TrTr'')<sub>3</sub>Tr, рTr(TrTr)<sub>3</sub>Tr и р(Tr)<sub>3</sub>, которые сразу после удаления концевой 3'-S-метильной защиты с соответствующих производных (Xa), (Xб), (X) и (XI) и экстракции хлороформом подвергали гель-электрофоретическому анализу (рис. 3).

*Частичный и полный гидролиз метилфосфонатных связей в октатимидилатах водным аммиаком.* 50 мкмоль каждого из <sup>32</sup>P-меченых октатимидилатов (Xa), (Xб), (X) и (XI) обрабатывали по 40 мкл 25% водного аммиака в течение 2 или 24 ч при 70° С, аммиак удаляли упариванием в вакууме, остаток растворяли в 80% формамиде, содержащем красители бромфеноловый синий и ксиленцианол, наносили на 20% ПААГ, содержащий 7 М мочевины, и подвергали гель-электрофоретическому анализу (рис. 4).

*4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил) бензилфосфамидные производные (XIV)–(XVII), (XVa), (XVб), (XVIIa) и (XVIIб).* К 0,12 мкмоль соответствующего октатимидилата, содержащего либо 3'-, либо 5'-фосфатные группы, в 20 мкл воды добавляли 16 мкл 8% водного раствора цетилтриметиламмонийбромида. Полученный раствор замораживали в жидком азоте и лиофилизировали до сухого остатка над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (4–5 ч, 20° С). Полученный рыхлый осадок растворяли в 20–40 мкл абс. диметилформамида и, согласно работе [19], последовательно добавляли 5 мкл 0,5 М раствора 2,2'-дипиридилдисульфида в абс. диметилформамиде, 5 мкл 1 М раствора N-метилимидазола, 5 мкл 0,5 М раствора трифенилфосфина в диметилформамиде. Через 10 мин в реакционную смесь добавляли 5 мкл 0,5 М свежеприготовленного раствора амина NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>RCl в диметилформамиде, выдерживали 20 мин при 20° С и осаждали олигонуклеотидное производное добавлением 1 мл 2% раствора LiClO<sub>4</sub> в ацетоне, осадок промывали ацетоном. Полученный реагент очищали ВЭЖХ в обращенной фазе (рис. 5). Выход реагента, по данным обращенно-фазовой хроматографии, 80–90%. Сразу после хроматографии раствор реагента упаривали в вакууме при 20–25° С, остаток растворяли в 300 мкл 50% водного ацетона и осаждали 10 объемами 2% LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. Осадок промывали ацетоном и сразу сушили над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> при 0° ÷ –20° С. Водные растворы реагента хранили в жидком азоте. При выделении реагента все операции проводили быстро, промежуточные растворы хранили при 0° С. Реакционную способность к алкилированию полученных производных проверяли по реакции с тиосульфатом [20]. Реакции алкилирования тиосульфата протекали во всех случаях с почти количественными выходами (не ниже 95%) (рис. 6).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф. // Биорган. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 259–266.
2. Lesnikowski Z. J., Wolkanin P. J., Stec W. J. // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 45. P. 5535–5538.
3. Jayaraman K., McParland K., Miller P. S., Ts'O P. O. P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 3. P. 1537–1541.

4. Miller P. S., Agris C. H., Aurelian L., Blake K. R., Murakami A., Reddy M. P., Spitz S. A., Ts'O P. O. P. // *Biochemie*. 1985. V. 67. № 7/8. P. 769-776.
5. Agris C. H., Blake K. R., Miller P. S., Reddy M. P., Ts'O P. O. P. // *Biochemistry*. 1986. V. 25. № 20. P. 6268-6275.
6. Miller P. S., Dreon N., Pulford S., McParland K. B. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 20. P. 9659-9665.
7. Miller P. S., McParland K. B., Sayaraman K., Ts'O P. O. P. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. № 7. P. 1874-1880.
8. Miller P. S., Yano J., Yano E., Carroll C., Jayaraman K., Ts'O P. O. P. // *Biochemistry*. 1979. V. 18. № 23. P. 5134-5143.
9. Marugg J. E., de Vroom E., Dreef C. E., Tromp M., van der Marel G. A., van Boom J. H. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 5. P. 2171-2185.
10. Miller P. S., Reddy M. P., Muracami A., Blake K. R., Shwu-BinLin, Agris C. H. // *Biochemistry*. 1986. V. 25. № 18. P. 5092-5097.
11. Jäger A., Engels J. // *Tetrahedron Lett.* 1984. V. 25. № 14. P. 1437-1440.
12. Dorman M. A., Noble S. A., McBride L. J., Caruthers M. H. // *Tetrahedron*. 1984. V. 40. № 1. P. 95-102.
13. Miller P. S., Anman N. D., McParland K. B., Pulford S. M. // *Biochemistry*. 1982. V. 21. № 10. P. 2507-2512.
14. Noble S. A., Fisher E. F., Caruthers M. H. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 7. P. 3387-3404.
15. Кумарев В. П., Баранова Л. В., Богачев В. С., Лебедев А. В., Обухова Л. В. // *Биоорган. химия*. 1986. Т. 12. № 10. С. 1348-1358.
16. Miller P. S., Agris C. H., Muracami A., Reddy P. M., Spitz S. A., Ts'O P. O. P. // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. № 18. P. 6225-6242.
17. Murakami A., Blake K. R., Miller P. S. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 15. P. 4041-4046.
18. Амирханов Н. В., Кумарев В. П., Ривкин М. И., Рыбаков В. Н. // *Биоорган. химия*. 1982. Т. 8. № 1. С. 126-129.
19. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. // *Биоорган. химия*. 1986. Т. 12. № 4. С. 475-481.
20. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подыминогих М. А., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. № 9. С. 1212-1220.
21. Абрамова Т. В., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Пичко Н. П., Федорова О. С. // *Биоорган. химия*. 1985. Т. 11. № 12. С. 1642-1649.
22. Ефимов В. А., Бурякова А. А., Ревердатто С. В., Чахмахчева О. Г. // *Биоорган. химия*. 1983. Т. 9. № 10. С. 1367-1381.
23. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // *Биоорган. химия*. 1983. Т. 9. № 4. С. 516-521.

Поступила в редакцию  
14.IV.1988

**REACTIVE OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES BEARING  
METHYLPHOSPHONATE GROUPS. II. SYNTHESIS OF STEREOREGULAR  
OCTATHYMIDYLATES CONTAINING AN ALKYLATING  
4-(N-2-CHLOROETHYL-N-METHYLAMINO)BENZYLAMINE GROUP  
AND ALTERNATING METHYLPHOSPHONATE RESIDUES**

AMIRKhanov N. V., ZARYTOVA V. F.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division  
of the Academy of Sciences of the USSR*

Octathymidylates bearing alternating methylphosphonate residues with  $R_p$  and  $S_p$  configuration ( $p'$  and  $p''$ , respectively), viz.  $Tp(TpTp')_3TpSCH_3$  (I) and  $Tp(TpTp'')_3TpSCH_3$  (II), have been prepared. Diastereomer (I) forms more stable complementary complex with  $d(C_5A_8C_5)$  than (II) ( $T_m$  20 and  $<3^\circ C$ , respectively). Reactive octathymidylate derivatives  $CIRCH_2NHpTp(TpTp')_3TpSCH_3$ ,  $CIRCH_2NHpTp(TpTp'')_3TpSCH_3$ ,  $Tp(TpTp')_3TpNHCH_2RCl$  and  $Tp(TpTp'')_3TpNHCH_2RCl$  bearing alkylating 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylamine ( $CIRCH_2NH-$ ) residue either at 5'- or 3'-phosphate groups of oligonucleotides were synthesised using compounds (I) and (II).