



УДК 577.113.4 + 615.779.9 : 543.422.25

© 1990 г.

*Т. С. Годовикова, В. Ф. Зарытова, С. Г. Лохов,
Т. В. Мальцева, Д. С. Сергеев*

СИНТЕЗ, СТРУКТУРА И СВОЙСТВА РУБОМИЦИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МОНО- И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР

Используя производные моно- и олигонуклеотидов с активной цвиттер-ионной концевой фосфатной группой, содержащей остаток 4-диметиламинопиридина (Ia—v), мы осуществили синтез рубомициновых производных рТ (IIa) и олигонуклеотидов. Получены одно- и двумерные (COSY и NOESY) спектры и проведено отнесение сигналов протонов в соединении (IIa). На основании обнаруженной кросс-релаксации между H₆ тимидина и H1' и H2'a, H2'b углеводного остатка рубомицина сделано заключение о существовании достаточно устойчивой конформации молекулы (IIa) в DMSO-d₆, обеспеченной, вероятно, стеклинг-взаимодействием между остатками мононуклеотида и рубомицина. Установлено, что введение рубомицинового остатка в олигонуклеотид повышает стабильность комплементарных комплексов.

В настоящее время ведется интенсивный поиск и конструирование соединений, воздействующих на определенные, в том числе вирусные, НК. Для этих целей перспективны олигонуклеотиды, способные образовывать комплементарные комплексы с выбранными участками НК, функцию которой необходимо «выключить». Для создания более эффективно действующих препаратов в олигонуклеотид вводят группировки, повреждающие НК или способствующие стабилизации комплементарного комплекса [1—4]. Полезным может оказаться введение в олигонуклеотид различных антибиотиков, способных стабилизировать дуплексы и действовать на НК. Такой подход может привести к созданию новых биологически активных соединений, целенаправленно действующих на генетический аппарат клетки. К числу антибиотиков, ингибирующих синтез НК, относятся противоопухолевые антибиотики антрациклинового ряда, в частности рубомицин [5—7]. Известно, что они способны связываться с НК [8, 9] и, кроме того, действовать на ферментативные системы, обеспечивающие наработку НК в клетке [10, 11].

В настоящей работе осуществлен синтез, исследована структура и некоторые свойства рубомициновых производных моно- и олигонуклеотидов.

При ковалентном присоединении рубомицина к моно- и олигонуклеотидам важно предотвратить модификацию функциональных групп антибиотика, ответственных за биологическую активность. Авторами работ [12, 13] были получены производные рубомицина и доксорубицина по аминокгруппе сахарного остатка, противоопухолевая активность которых более чем на порядок выше активности исходных антибиотиков, а цитотоксичное действие слабее. Следовательно, можно надеяться, что модификация аминокгруппы сахара не приведет к существенной потере биологической активности рубомицина.

Для максимального сохранения способности олигонуклеотидов к комплексобразованию ковалентное присоединение рубомицинового остатка

Сокращения: символ «d» в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен; H, H_T — протоны остатков агликона рубомицина и тимидина соответственно; H', H_T' — протоны углеводного остатка рубомицина и тимидина; НК — вуклевновая кислота; RmH·HCl — гидрохлорид рубомицина; DMAP — 4-диметиламинопиридин; ЯЭО — ядерный эффект Оверхаузера; COSY — двумерный J-корреляционный спектр; NOESY — двумерный спектр ЯЭО.

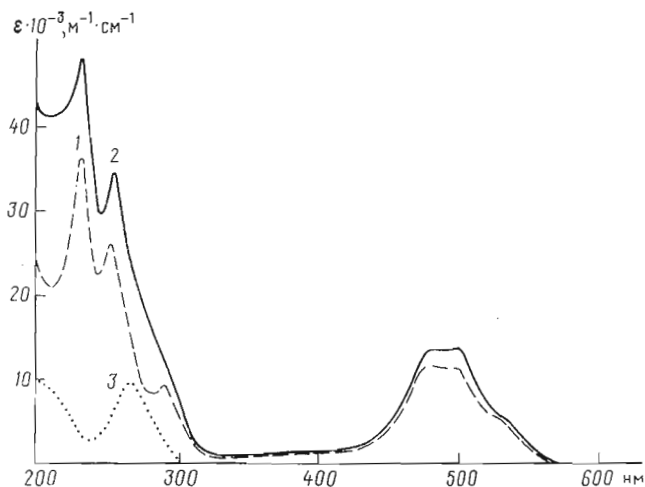
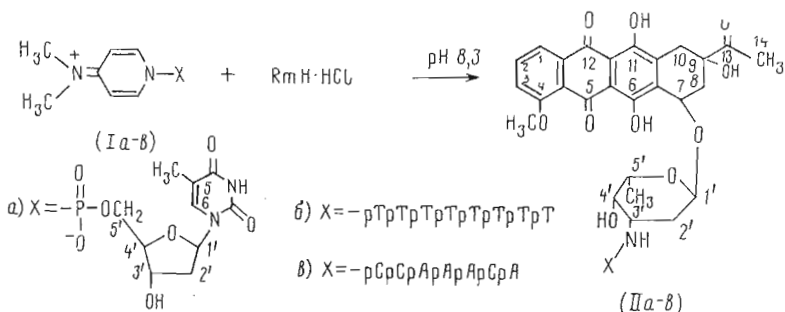


Рис. 1. Электронные спектры поглощения рубомицина (1), тимидин-5'-фосфата (2) и его рубомицинового производного (IIa) (3)

осуществляли по 5'-концевой фосфатной группе. Активацию последней мы проводили в присутствии 4-диметиламинопиридина с использованием смеси трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида, поскольку ранее было показано, что образующиеся в ходе активации 4-диметиламинопиридиниевые производные моно- и динуклеотидов быстро и количественно реагируют с алифатическими аминами с образованием соответствующих фосфамидов [14]. Взаимодействие же с гидроксигруппами протекает гораздо медленнее. Это позволяло надеяться, что в случае реакции с рубомицином в первую очередь будет фосфорилироваться аминогруппа сахара. Образующиеся реакционноспособные фосфамиды (Ia—в) с цвиттер-ионной концевой фосфатной группой предварительно отделяли от остальных компонентов реакционной смеси и прибавляли к водным растворам рубомицина.



За протеканием реакции фосфамида (Ia) с рубомицином следили с помощью ^{31}P -ЯМР. Известно [15], что в спектрах ^{31}P -ЯМР сигналы ядер атомов фосфора амидов фосфоэфиров, в которых атом азота участвует в образовании ароматической π -системы, регистрируются на 7—14 м.д. в более сильном поле, а сигналы ядер фосфора алифатических фосфамидов — на 6—7 м.д. в более слабом поле, чем для 85% H_3PO_4 . Это дает возможность тестировать тип фосфамида и отличать фосфамиды от фосфоэфиров. При взаимодействии производного (Ia) с RmH через 2 ч помимо сигналов вещества (Ia) и pT (продукта гидролиза амида (Ia)) регистрируется сигнал с δ 6,4 м.д., смещенный относительно сигнала исходного соединения (Ia) на 12 м.д. в слабое поле. Это свидетельствует об образовании алифатического фосфамида и, следовательно, о протекании реакции между активированным фосфатом мононуклеотида и аминогруппой сахара рубомицина с образованием соединения (IIa).

Последнее было выделено из реакционной смеси обращенно-фазовой ВЭЖХ и дополнительно охарактеризовано. Как видно из рис. 1, электрон-

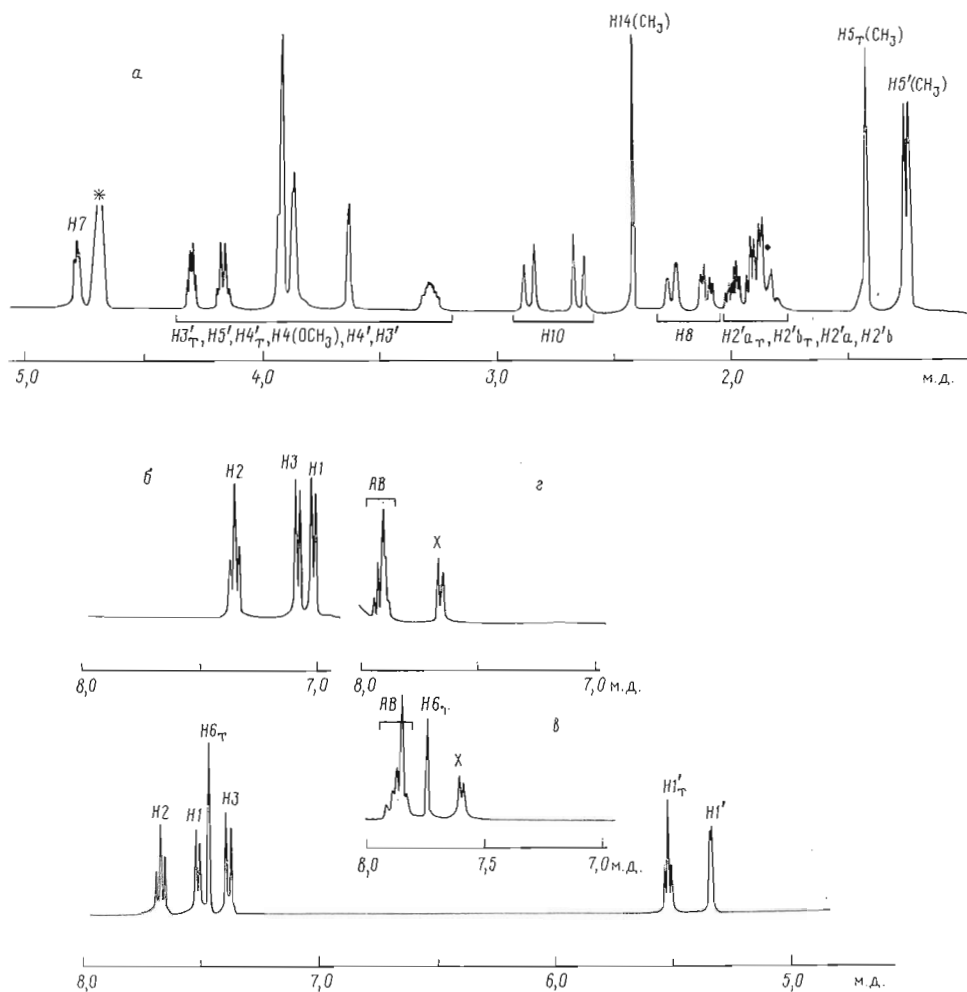
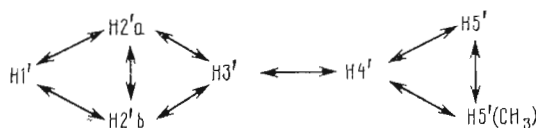


Рис. 2. ^1H -ЯМР-спектр производного (IIa) в D_2O . Звездочкой обозначен сигнал примеси H_2O (a) и фрагменты ^1H -ЯМР-спектров в области 8,0–7,0 м. д.: рубомицина D_2O (б), производного (IIa) в $\text{DMSO}-d_6$ (в), рубомицина в $\text{DMSO}-d_6$ (г)

ный спектр поглощения полученного соединения (IIa) является практически суперпозицией спектров поглощения рТ и рубомицина, что согласуется с его структурой. Окончательно подтверждают строение рубомицинового производного рТ данные, полученные с помощью одно- и двумерного ^1H -ЯМР, позволяющие также сделать заключение о пространственной организации молекулы (IIa).

Спектр необменивающихся протонов соединения (IIa) в D_2O представлен на рис. 2. Там же показаны области локализации сигналов протонов основания, агликона и углеводов. Идентификацию сигналов осуществляли, анализируя двумерный J -корреляционный (COSY) спектр (рис. 3), который позволил выявить ядра, связанные скалярным спин-спиновым взаимодействием. Протоны углеводного остатка рубомицина относили по схеме 1

Схема 1



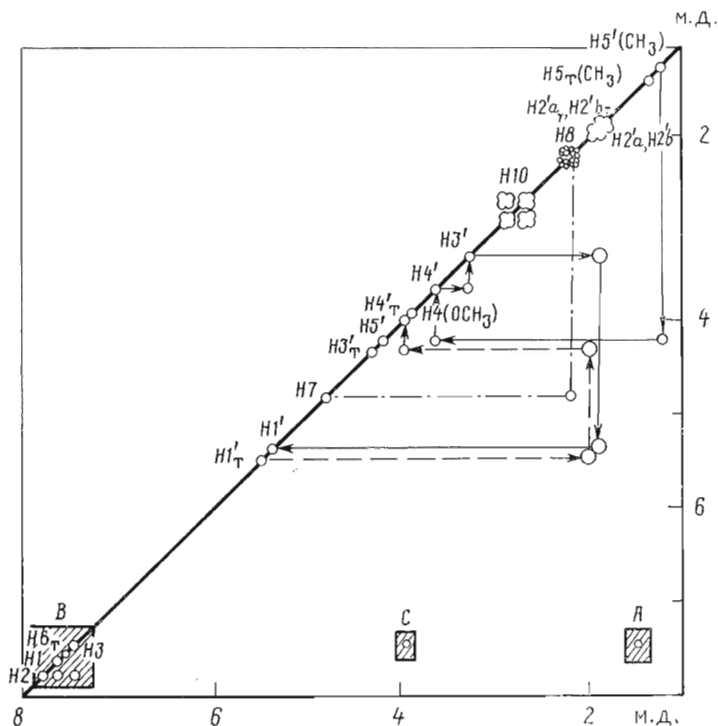
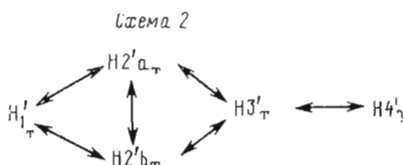


Рис. 3. Схематичное изображение COSY-спектра производного (IIa) в D_2O . Сплошной линией соединены кросс-пики углеводного остатка рибомидина, штриховой — протоны дезоксирибозы тимидина, штрихпунктирной — ароматические протоны H7 и H8 агликона

Протоны дезоксирибозы отнесены по схеме 2



В сильнополюсной области спектра (1,5—1,0 м.д.) (рис. 2a), характерной для проявления протонов CH_3 -группы, регистрируются два сигнала. Первый резонирует при 1,455 м.д. и принадлежит протонам CH_3 -группы тимидина, так как дает кросс-пик (рис. 3, область A) с протоном, резонирующим в области ароматических протонов тимидина ($H6_T$). Второй сигнал проявляется в виде дублета при 1,280 и 1,296 м.д. (рис. 2a) и в COSY-спектре (рис. 3) дает кросс-пик с протоном $H5'$ углеводной части рибомидина. Этих данных достаточно для однозначного отнесения дублета к протонам CH_3 -группы в 5'-положении углеводного остатка рибомидина. Расщепление сигнала в данном случае обусловлено взаимодействием протонов $H5'$ (CH_3) с соседним протоном $H5'$. Выбрав в качестве стартового сигнал $H5'$ (CH_3), мы через соответствующие кросс-пики отнесли все сигналы протонов в углеводной части рибомидина: $H5'$, $H4'$, $H3'$, $H2'a$, $H2'b$, $H1'$ (рис. 3, см. сплошные линии). Значения химических сдвигов всех протонов представлены в таблице.

Для протонов дезоксирибозного остатка нуклеотида в качестве стартового выбран сигнал $H1'т$, как правило резонирующий в области 5,0—5,5 м. д. На рис. 2a видно, что в этом районе спектра находятся два сигнала. Сигнал с химическим сдвигом 5,365 м.д. отнесен нами по схеме 1 к протону $H1'$ углеводного остатка рибомидина, а оставшийся триплет с центром при 5,545 м. д. — к $H1'т$. Далее, в соответствии со схемой 2

Значения химических сдвигов протонов рубомицина (RmH) и рубомицинового производного тимидин-5'-фосфата (IIa) в D₂O и DMSO-d₆^a

Обозначение протона	D ₂ O		DMSO-d ₆	
	RmH	(IIa)	RmH	(IIa)
H1	7,060	7,539	7,87–7,93 ^б	7,81–7,90 ^б
H2	7,397	7,696		
H3	7,127	7,410	7,648	7,579
H4 (OCH ₃)	3,740	3,946	4,005	3,973
H7	4,699	4,810	4,94	4,896
H8a	2,051	2,131	2,119	2,12–2,26 ^в
H8b	2,199	2,281	2,211	
H10a	2,560	2,676	2,903	2,888
H10b	2,764	2,884	2,953	2,988
H14 (CH ₃)	2,439	2,452	2,324	2,277
H5' (CH ₃) ^г	1,319,	1,280,	1,197,	1,148,
	1,335	1,296	1,213	1,164
H5'	4,262	4,193	4,246	4,077
H4'	3,900	3,660	3,67	3,491
H3'	3,781	3,330	3,38 ^д	3,23
H2'a, H2'b	1,963–2,035	1,897–1,947	1,740–1,930	1,62–1,81
H1'	5,423	5,365	5,344	5,206
H6 _T	—	7,492	—	7,722
H5 _T (CH ₃)	—	4,455	—	4,739
H4' _T	—	3,959 ^е	—	3,821
H3' _T	—	4,326	—	4,264
H2'a _T , H2'b _T	—	1,947–2,020	—	1,98–2,09
H1' _T	—	5,545	—	6,072
—NH ₂ , —NH—	—	—	8,03 (NH ₂)	11,09 (—NH—)
—OH4'	—	—	5,472	5,70
—OH9	—	—	5,557	6,22

^a Цифровое разрешение прибора 0,0018 м.д./точка. Значения химических сдвигов с двумя значащими цифрами приведены для уширенных сигналов.

^б Приведена полоса поглощения АВ-протонов системы АВХ.

^в Сигналы системы АВ уширены, приведена полоса поглощения.

^г Сигнал протонов H5'(CH₃) проявляется в виде дублета.

^д Сигнал проявляется в виде плеча.

^е Совпадает с сигналом примеси H₂O, идентифицируется по COSY-спектру.

(рис. 3, см. пунктирные линии) выполнено отнесение сигналов дезоксирибозы: H2'a_T, H2'b_T, H3'_T, H4'_T.

Ароматические протоны H1, H2 и H3 агликона рубомицина и H6_T находятся в слабополюной области спектра 8,0—7,0 м. д. (рис. 2a). Их отнесение осуществлено также с использованием кросс-пиков COSY-спектра (рис. 3, область В). Для рубомицина и производного (IIa) в D₂O самый слабополюный сигнал проявляется в виде триплета. В COSY-спектре исследуемых соединений этот сигнал дает два кросс-пика с дублетами. Полученные данные позволяют отнести слабополюный сигнал к ароматическому протону H2 агликона, взаимодействующему с соседними протонами H1 и H3. Сильнополюный дублет соединения (IIa) в области 8,0—7,0 м. д. был отнесен к протону H3 агликона, поскольку он имеет слабополюный кросс-пик с протонами OCH₃-группы этого же ароматического кольца (рис. 3, область С).

Таким образом, химические сдвиги сигналов ароматических протонов агликона соединения (IIa) в D₂O уменьшаются в следующем порядке: H2, H1 и H3. Однако для исходного рубомицина порядок уменьшения химических сдвигов этих протонов в спектре иной: H2, H3 и H1. Возможно, это обусловлено разницей в способности к самоагрегации [16] рубомицинового остатка в самом антибиотике и в соединении (IIa). Сопоставление значений химических сдвигов, представленных в таблице, для рубомицина и производного (IIa) свидетельствует о том, что ароматические протоны H1, H2, H3 соединения (IIa) в D₂O дезэкранированы по сравнению с соответствующими протонами рубомицина (рис. 2a, б).

При замене D_2O на $DMSO-d_6$ система сигналов ароматических протонов агликона в рубомицине и соединении (IIa) усложняется (становится сильно связанной — ABX) (таблица, рис. 2*в, г*). Протоном X в $DMSO-d_6$ для рубомицина и соединения (IIa) однозначно является H3 агликона, так как в обоих случаях он связан кросс-пиком с сигналом протонов OCH_3 -группы. Для протонов H1 и H2 в таблице указан интервал, где проявляются все полосы системы AB . Однозначное отношение этих сигналов AB в системе ABX возможно лишь с использованием математической обработки спектра [17].

Протоны H10a, H10b и H8a, H8b рубомицина и соединения (IIa) представляют собой AB -системы, различить которые удается в COSY-спектре по дополнительному взаимодействию протонов пары H8a, H8b с H7 (рис. 3, линия штрихпунктир).

Сигнал протонов метильной группы H14(CH_3) как в рубомицине, так и в его производном (IIa) представлен синглетом в обоих растворителях (таблица). В COSY-спектре исследуемых соединений этот сигнал дает два слабых кросс-пика с протонами H8 и H10.

Как видно из таблицы, максимальные изменения химических сдвигов наблюдаются для протонов аминогруппы сахара и соседнего с ней H3-протона при переходе от рубомицина к соединению (IIa). В спектре рубомицина в $DMSO-d_6$ сигнал NH_2 -группы наблюдается при 8,03 м.д. В спектре производного (IIa) этот сигнал отсутствует, появляется новый при 11,09 м.д., который относится к $\sim NH$ -группе. Это свидетельствует о вовлечении аминогруппы в образование ковалентной связи с тимидин-5'-фосфатом.

Экранирование ароматических протонов агликона в соединении (IIa) по сравнению с рубомицином в $DMSO-d_6$ возможно в результате стекинг-взаимодействия ароматической системы агликона и рГ. В пользу этого предположения свидетельствуют также данные NOESY (IIa) в $DMSO-d_6$.

Кросс-пики в NOESY-спектре отражают процессы кросс-релаксации между сближенными в пространстве протонами. Принципы последовательного отнесения сигналов в спектрах NOESY для правоспиральных ДНК-дууплексов детально описаны в работе [18]. В NOESY-спектре соединения (IIa) (рис. 4) проявляются кросс-пики, ответственные как за внутринуклеотидные взаимодействия ароматического протона H6_T с протонами дезоксирибозы (H1'_T, H2'_{aT}, H2'_{bT}) или H6_T с соседним H5_T (CH_3) (рис. 4, кросс-пики обозначены звездочкой), так и за взаимодействия H6_T с протонами H1', H2'a, H2'b сахара рубомицина (рис. 4, кросс-пики обозначены вертикальной стрелкой).

Наличие кросс-пика между ароматическим протоном тимидина и протонами сахара рубомицина говорит о существовании определенной конформации молекулы (IIa). По аналогии с динуклеотидами, для которых показано [18], что регистрация кросс-пиков между протонами гетероцикла и протонами дезоксирибозы свидетельствует о присутствии динуклеотида в правоспиральной ориентации, можно полагать, что и в исследуемом случае молекула (IIa) находится в такой же конформации. Следует отметить, что, если ЯЭО между пространственно сближенными протонами в динуклеотидах удается наблюдать лишь при температурах, близких к 0° С [19], то в исследуемой нами системе ЯЭО наблюдаются даже при 30° С. Стабильность правоспиральной конфигурации обеспечивается, возможно, большим, чем в случае с динуклеотидами, стекинг-взаимодействием между основанием тимидина и тетрагидротетраценхиновым хромофором рубомицина.

Таким образом, из данных спектроскопии ядерного магнитного резонанса и УФ-спектроскопии вытекает, что 4-диметиламинопиридиниевое производное тимидин-5'-фосфата (Ia) реагирует с аминогруппой сахара рубомицина с образованием соответствующего фосфамида (IIa). При этом реакция фосфорилирования настолько селективна, что гидроксигруппы антибиотика модификации в ходе синтеза не подвергаются.

При взаимодействии 4-диметиламинопиридиниевых производных олигонуклеотидов (Iб, в) с рубомицином в условиях, аналогичных синтезу

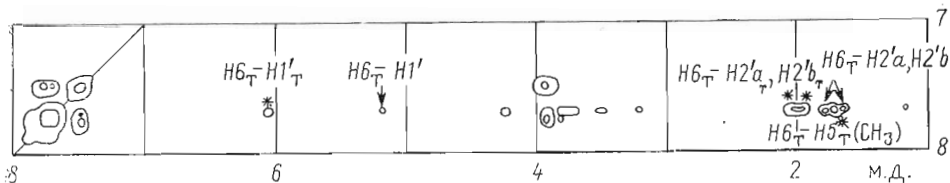


Рис. 4

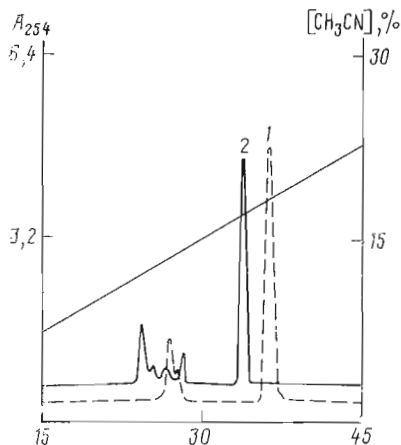


Рис. 5

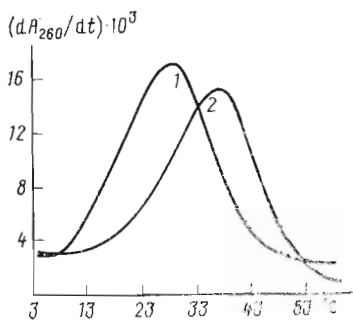


Рис. 6

Рис. 4. Фрагмент NOESY-спектра в $\text{DMSO-}d_6$ (время смешивания 400 мс) с иллюстрацией кросс-пиков взаимодействия протона основания H6_T с протонами метильной группы H5_T (CH_3), дезоксирибозы $\text{H1}'_T$, $\text{H2}'a_T$, $\text{H2}'b_T$ (обозначены звездочкой) и с протонами углеводной части рубомицина $\text{H1}'$, $\text{H2}'a$, $\text{H2}'b$ (обозначены стрелкой)

Рис. 5. Профили обращенно-фазовой хроматографии реакционных смесей при синтезе рубомициновых производных олигонуклеотидов (IIб) (1) и (IIв) (2). Колонка ($4,6 \times 250$ мм) с носителем Lichrosorb RP-18 (10 мкм), градиент 0—30% ацетонитрила в 0,05 М LiClO_4 (общий объем 60 мл)

Рис. 6. Дифференциальные кривые термической денатурации комплементарных комплексов олигонуклеотида рТрГрТрТрТрГрГрГрС с рСрСрАрАрАрСрА (1) или с его рубомициновым производным (IIв) (2) при концентрации компонентов $2,5 \cdot 10^{-5}$ М в 0,16 М NaCl , 0,02 М KH_2PO_4 , 0,1 мМ EDTA (рН 7,4)

соединения (IIа), были получены соответственно фосфамиды олигонуклеотидов (IIб, в). Последние выделяли из реакционной смеси обращенно-фазовой ВЭЖХ. Присоединение рубомицинового остатка с его системой ациклического и трех ароматических колец к олигонуклеотиду должно повышать гидрофобные свойства продукта реакции и, следовательно, уменьшать подвижность на обращенно-фазовом сорбенте. Действительно, соединения (IIб) и (IIв) задерживаются значительно дольше, чем исходные олигонуклеотиды (рис. 5).

Рубомициновое производное олигонуклеотида (IIб) элюируется с анионообменного сорбента как полианион, имеющий на один заряд меньше, чем исходный олигонуклеотид. В случае присоединения антибиотика к олигонуклеотиду через какую-либо ОН-группу полученное соединение в условиях ионообменной хроматографии (рН 6,5) должно иметь на два заряда меньше, чем исходный олигонуклеотид. Кроме того, в условиях гидролиза фосфамидной связи (0,1 н. HCl , 37°C) соединение (IIб), по данным ионообменной хроматографии, за 2,5 ч претерпевает количественное превращение с образованием исходного олигонуклеотида. Следовательно, при взаимодействии соединения (IIб) с антибиотиком фосфорилирование протекает по аминогруппе сахара рубомицина и при этом образуется фосфамид (IIб).

В электронном спектре поглощения соединений (IIб, в) наблюдаются полосы поглощения, характерные как для олигонуклеотидов (260 нм), так и для антибиотика (234, 290, 480—500 нм). Электронный спектр поглощения соединения (IIб) фактически не отличается от суперпозиции спектров олигонуклеотида и рубомицина (данные не приведены).

Принимая во внимание, что реакция рубомицина с 4-диметиламинопиридиневыми производными олигонуклеотидов должна быть идентична его реакции с аналогичным реакционноспособным фосфамидом тимидин-5'-фосфата, а также данные обращенно-фазовой, ионообменной хроматографии и УФ-спектроскопии, можно утверждать, что в ходе взаимодействия (Iб, в) с антибиотиком образуются соединения типа (IIб, в).

Введение в олигонуклеотиды рубомицинового остатка может сказаться на их способности образовывать комплементарные комплексы. Влияние антибиотика на комплексобразующие свойства олигонуклеотидов оценивали путем сравнения температуры плавления комплексов pTrGpTrGpGpC с pCpCpArArArCpA (т. пл. 28,0° C) или с его рубомициновым производным (IIв) (т. пл. 36,5° C) (рис. 6). Увеличение стабильности комплементарных комплексов олигонуклеотидов с введением в их структуру рубомицинового остатка позволяет надеяться, что конструированные нами производные антрациклинового антибиотика будут обладать большей эффективностью воздействия на ДНК-мишень по сравнению с исходным олигонуклеотидом.

Экспериментальная часть

В работе использованы гидрохлорид рубомицина (Институт по изысканию новых антибиотиков, Москва), трифенилфосфин, 2,2'-дипиридилдисульфид, 4-диметиламинопиридин (Fluka AG, Швейцария), тимидин-5'-монофосфат (опытное химическое производство НИОХ СО АН СССР), олигонуклеотиды pCpCpArArArCpA, pTrGpTrGpGpC, pTrGpTrGpTrGpGpC, pTrGpTrGpTrGpTrGpTrGpT, синтезированные модифицированным фосфотриэфирным методом синтеза [20].

N,N-Диметилформамид перегоняли под вакуумом по методике [21].

Выделение рубомициновых производных моно- и олигонуклеотидов (IIа—в) из реакционных смесей проводили обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Altex-332 (США). Для выделения соединения (IIа) использовали колонку (10 × 250 мм) со смолой Lichrosorb RP-18 (5—20 мкм, Merck, ФРГ) и градиент концентрации ацетонитрила от 0 до 80% в воде. Для выделения (IIб, в) использовали колонку (4,6 × 250 мм) со смолой Lichrosorb RP-18 (10 мкм, Merck, ФРГ) и градиент концентрации ацетонитрила от 0 до 30% в 0,05 M LiClO₄.

Спектры ³¹P-ЯМР записывали на импульсном спектрометре HX-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ BNC-12 (Bruker, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно 85% ортофосфорной кислоты. Спектры записывали с подавлением спин-спиновой взаимодействия с протонами. Реакцию 50 мкмоль соединения (Iа) со 100 мкмоль рубомицина проводили непосредственно в 10-мм ампуле в 1,4 мл 0,2 M водного NaHCO₃ (pH 8,3).

Одно- и двумерные ¹H-ЯМР-спектры записывали на спектрометре AM-400 (Bruker, ФРГ) и обрабатывали на компьютере Aspect 3000. Спектральная ширина 4000 Гц. Фазочувствительные NOESY-спектры получали при времени смешивания 0,4 с. Матрицу данных (1024 × 4096) умножали в направлении ω_2 на гауссову функцию, а в направлении ω_1 — на квадрат синусоидальной функции. Затем проводили фурье-преобразование и фазовую корректировку двумерного спектра. COSY-спектры записывали при следующих условиях: 4096 точек в направлении ω_2 и 512 точек в направлении ω_1 . Исследуемый образец (IIа) после очистки обращенно-фазовой хроматографией пропускали через колонку с дауэксом 50 × 4 (Merck, ФРГ) в Na⁺-форме и лиофилизировали 2 раза из D₂O. Раствор образца (концентрация 3,5·10⁻² M) либо в DMSO-d₆ (99,8%), либо в 0,1 M NaCl, 0,01 M NaD₂PO₄, 0,01 mM EDTA (pH 7,4) в D₂O (99,8%)

помещали в 5-мм ампулу. Гидрохлорид рубомицина дважды лиофилизировали из D_2O и без дополнительной очистки использовали для приготовления образца аналогично соединению (IIa). Спектры записывали при $30^\circ C$, в качестве стандарта использовали натрий-4,4-диметил-4-силанпентан-1-сульфонат.

Электронные спектры поглощения моно-, олигонуклеотидов и их производных (10^{-5} М в буферном растворе 0,02 М KH_2PO_4 , 0,16 М NaCl, 0,1 мМ EDTA, pH 7,4) записывали при $20^\circ C$ на спектрофотометре Spectord M 40 (Carl Zeiss Iena, ГДР).

Кислотный гидролиз производного (IIб) проводили в 0,1 н. HCl при $37^\circ C$ в течение 2,5 ч при концентрации $2,5 \cdot 10^{-5}$ М. Реакционную смесь анализировали ионообменной ВЭЖХ на хроматографе Waters-510 (Millipore, Франция). Использовали колонку ($5,6 \times 250$ мм) с носителем Полисил СА (10 мкм) [22] и градиент концентрации KH_2PO_4 (pH 6,5) от 0,02 до 0,3 М в 30% водном ацетонитриле.

Кривые плавления комплементарных комплексов олигонуклеотидов записывали с помощью установки для исследования термической денатурации в ультрамикромасштабе на базе спектрофотометра «Обь-4» (НИИХ СО АН СССР) при концентрации компонентов $2,5 \cdot 10^{-5}$ М в 0,16 М NaCl, 0,02 М KH_2PO_4 , 0,1 мМ EDTA (pH 7,4).

Радиоактивность моно-, олигонуклеотидов и их производных определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Rackbeta (Wallas Oy, Финляндия) в диоксановом сцинтилляторе.

Синтез рубомицинового производного тимидин-5'-фосфата (IIa). Растворяли 58 мг (180 мкмоль) тимидин-5'-фосфата в виде свободной кислоты в 200 мкл H_2O и добавляли 25 мкл (180 мкмоль) триэтиламина. Смесь упаривали до маслообразного состояния, растворяли в 1 мл DMF и добавляли 424 мг (1,62 ммоль) Ph_3P , 356 мг (1,62 ммоль) $(PyS)_2$ и 132 мг (1,08 ммоль) DMAP. Через 20 мин выпавший осадок (Ia) отделяли центрифугированием, промывали ацетоном (10 мл \times 3) и сушили 15 мин под вакуумом (10—15 мм рт. ст.). Выход 30%. К раствору 21,3 мг (50 мкмоль) соединения (Ia) в 1,4 мл 0,2 М водного $NaHCO_3$ (pH 8,3) добавляли 56,3 мг (100 мкмоль) $RmH \cdot HCl$. Через 24 ч продукт выделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выход не менее 80%.

Синтез рубомициновых производных олигонуклеотидов (IIб, в). К раствору 0,15 мкмоль цетавлоновой соли олигонуклеотида в 40 мкл DMF добавляли 3,5 мг (13 мкмоль) Ph_3P , 3 мг (13 мкмоль) $(PyS)_2$ и 1,6 мг (13 мкмоль) DMAP. Смесь выдерживала 20 мин при $20^\circ C$, затем олигонуклеотидный материал осаждали 10-кратным избытком 2% раствора $LiClO_4$ в ацетоне. Осадок отделяли, промывали ацетоном (1 мл \times 3) и сушили 15 мин под вакуумом (10—15 мм рт. ст.). Полученные производные (Iб, в) растворяли в 20 мкл 0,2 М водного $NaHCO_3$, добавляли 1 мг (1,8 мкмоль) $RmH \cdot HCl$. Продукт через 6 ч выделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выход 70%.

Для производных моно- и олигонуклеотидов (IIa—в) молярный коэффициент поглощения в растворе, содержащем 0,16 М NaCl, 0,02 М KH_2PO_4 , 0,1 мМ EDTA (pH 7,4), $\epsilon_{260} = 31,8 \cdot 10^3$, $86 \cdot 10^3$, $77 \cdot 10^3$ $M^{-1} cm^{-1}$ соответственно, определяли методом радиоизотопной метки [3]. При этом меткой в олигонуклеотидах служил ^{32}P на 5'-конце, вводимый по методике [23] с использованием $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ (до 3000 Ки/ммоль, отечественное производство), T4-полинуклеотидкиназы (КФ 2.7.1.78) и ADP. Для определения молярного коэффициента поглощения соединения (IIa) использовали $[^3H]$ тимидин-5'-монофосфат (940 ТБк/моль, отечественное производство). Молярные коэффициенты поглощения олигонуклеотидов pCrCrArArArCrA ($\epsilon_{260} = 66 \cdot 10^3$ $M^{-1} cm^{-1}$), pTrGrTrGrTrGrGrC ($\epsilon_{260} = 66 \cdot 10^3$ $M^{-1} cm^{-1}$) определяли по оптической плотности раствора после полного гидролиза последних фосфодиэстеразой змеиного яда [24]. Молярный коэффициент поглощения pTrTrTrTrTrTrTrTrT ($\epsilon_{260} = 69 \cdot 10^3$ $M^{-1} cm^{-1}$) использовали из работы [25].

Авторы благодарят И. В. Кутявина (ИИХ СО АН СССР) за помощь в определении молярных коэффициентов поглощения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Letsinger R. L., Schott M. E.* // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 24. P. 7394—7395.
2. *Asseline U., Toulme F., Thuong N. T., Delarue M., Helene C.* // EMBO J. 1984. V. 3. № 4. P. 795—800.
3. *Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В.* // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911—920.
4. *Francois J.-C., Saison-Behmoaras T., Chassignol M., Thuong N. T., Helene C.* // C. r. Acad. sci. 1988. V. 307. Ser. III. P. 849—854.
5. *Calendi E., Di Marco A., Reggiani M., Scaprinato B., Valentini L.* // Biochim. et biophys. acta. 1965. V. 103. № 1. P. 25—40.
6. *Дудник Ю. В., Останина Л. Н., Козьян Л. И., Гаузе Г. Ф.* // Антибиотики. 1974. Т. 19. № 6. С. 514—517.
7. *Гаузе Г. Ф., Дудник Ю. В.* Противоопухолевые антибиотики. М.: Медицина, 1987. С. 19—41.
8. *Patel D. J., Kozlowski S. A., Rice J. A.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 6. P. 3333—3337.
9. *Баранов Е. П., Брикенштейн В. Х., Дмитриевская Г. В., Баренбойм Г. М.* // Антибиотики. 1984. Т. 29. № 3. С. 208—214.
10. *Schwartz H. S.* // Molecular aspects of anticancer drug action / Eds Neidle S., Waring M. J. L.: The Mac Millan Press, 1983. P. 93—125.
11. *Logan K., Ackerman S.* // DNA. 1988. V. 7. № 7. P. 483—491.
12. *Acton E. M., Tong G. L., Mosher C. W.* // J. Med. Chem. 1984. V. 27. № 5. P. 638—645.
13. *Johnston J. B., Glazer R. I.* // Cancer Res. 1983. V. 43. № 3. P. 1044—1048.
14. *Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.* // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475—481.
15. *Лебедев А. В., Резвухин А. И.* // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. № 2. С. 149—185.
16. *Chaires J. B., Dattagupta N., Crothers D. M.* // Biochemistry. 1982. V. 21. № 17. P. 3927—3932.
17. *Гюнтер Х.* Введение в курс спектроскопии ЯМР: Пер. с англ. М.: Мир, 1984. С. 170—202.
18. *Флорентьева В. Л.* // Молекулярная биология. 1987. Т. 21. № 3. С. 593—614.
19. *Kan L.-S., Cheng D. M., Chandrasegaran S., Pramanik P., Miller P. S.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 1987. V. 4. № 5. P. 785—796.
20. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П.* // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 516—521.
21. *Гордон А., Форд Р.* Спутник химика: Пер. с англ. М.: Мир, 1976. С. 439.
22. *Ястребов С. И.* Способ получения сорбента: А. с. 1153976 СССР // Б. И. 1985. № 17. С. 28.
23. *Berkner K. L., Folk W. R.* // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 10. P. 3176—3184.
24. *Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Drutsa V. L., Melnikova N. P., Purnal A. A.* // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 21. P. 5747—5761.
25. *Левина А. С., Невинский Г. А., Лаврик О. И.* // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 358—369.

Поступила в редакцию
15.XI.1989

T. S. GODOVIKOVA, V. F. ZARYTOVA, S. G. LOKHOV, T. V. MALTSEVA,
D. S. SERGEEV

**SYNTHESIS, STRUCTURE AND PROPERTIES OF DAUNOMYCIN
OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES**

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

Daunomycin derivatives of pT(DT) and oligodeoxynucleotides were synthesized using reactive zwitter-ionic 4-N,N-dimethylaminopyridine derivatives of the terminal phosphate group. Daunomycin oligodeoxynucleotide analogues form more stable complementary complexes than the corresponding non-modified oligonucleotides. Both one- and two-dimensional (2D NOESY and 2D COSY) NMR spectra of DT were recorded and the proton signals assigned. From the detected cross-relaxation between H6 of thymidine and H1', H2', H2'' of the carbohydrate residue of daunomycin it was concluded that, in DMSO, the DT molecule has a rather stable conformation, apparently due to the stacking interaction between the mononucleotide and daunomycin residues.