



УДК 577.113.4

РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ФОСФОТИОАТНЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ. I. СЕЛЕКТИВНАЯ АКТИВАЦИЯ КОНЦЕВЫХ ФОСФАТОВ И ПОЛУЧЕНИЕ ФОСФАМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФОСФОТИОАТНЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 1995 г. Н. В. Амирханов, В. Ф. Зарытова

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 20.05.94 г.

С использованием окислительно-восстановительной пары трифенилфосфин–дипиридилдисульфид осуществлена селективная активация концевых фосфатов олигонуклеотидных аналогов, содержащих межнуклеотидные фосфотиоатные группы (ps), что легло в основу нового способа синтеза различных производных фосфотиоатных аналогов олигонуклеотидов. Предложенным способом получены цвиттер-ионные 3'-фосфамидные производные ди- и тринуклеотидфосфотиоатов TrpTrp и TrpTrpTrp, содержащие остаток 4-диметиламинопиридина или N-метилимидазола. Полученные цвиттер-ионные производные реагируют с аминами с образованием в течение 5 - 10 мин соответствующих 3'-фосфамидов практически количественно и без повреждения межнуклеотидных фосфотиоатных групп. Предложенным способом получены также алкилирующие производные фосфотиоатов TrpTrp(N(CH₃)CH₂RCI) и TrpTrpTrp(N(CH₃)CH₂RCI) (RCI = -C₆H₄N(CH₃)CH₂CH₂Cl). Показано, что в ходе синтеза в DMF межнуклеотидные фосфотиоатные остатки исследуемых ФТАО устойчивы. Активность алкилирующих RCI-групп в полученных соединениях сохраняется и составляет 85 - 90%.

Ключевые слова: фосфотиоатные аналоги, олигонуклеотиды, трифенилфосфин–дипиридилдисульфид, 3'-фосфамиды, спектроскопия ³¹P-ЯМР.

Фосфотиоатные аналоги олигонуклеотидов (ФТАО) нашли широкое применение в качестве антисенсовых последовательностей для подавления жизнедеятельности различных РНК-вирусов как *in vitro*, так и *in vivo* [1 - 5].

Преимущество ФТАО по сравнению с обычными природными олигонуклеотидами заключается в их устойчивости к действию клеточных нуклеаз [6], а по сравнению с метилфосфонатными аналогами олигонуклеотидов – в хорошей растворимости в водных средах и возможности расщепления РНК РНКазой H в составе двухцепочечного комплекса с ФТАО [7].

Для усиления воздействия олигонуклеотидов на генетический аппарат клетки в структуру олигонуклеотидов или их аналогов вводят различные,

в том числе и реакционноспособные, группировки, способные стабилизировать комплементарные комплексы (например, интеркалирующие группировки [8 - 10]), улучшать проникающую способность олигонуклеотидов (например, остатки стероидов [11 - 15]) или повреждать нуклеиновые кислоты (например, алкилирующие, фотоактивные, окислительно-восстановительные группировки [4, 5, 16, 17]).

На сегодняшний день хорошо изучены реакционноспособные производные природных олигонуклеотидов [16, 17], а также производные ФТАО, несущие в своем составе остатки липофильных химических групп [12 - 15] или остатки акридина [10].

Различные химические группировки вводятся в состав ФТАО преимущественно при синтезе последних на полимерном носителе [10, 12 - 15]. Однако такой способ неэффективен для введения реакционноспособных или малоустойчивых химических групп, поскольку последние при снятии защит с гетероциклических оснований фосфотиоатов и удаления целевого продукта с полимерного носителя могут менять свою реакционную способность или другие химические свойства.

Используемые сокращения: ОВП – окислительно-восстановительная пара, ФТАО – фосфотиоатные аналоги олигонуклеотидов, DMTr – диметокситритил, CNEt – 2-цианэтил, Py – пиридин, DOX – диоксан, TPS-Cl – 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, MeIm – N-метилимидазол, DMAP – 4-диметиламинопиридин, (PyS)₂ – 2,2'-дипиридилдисульфид, DMF – диметилформамид, NH₂Bn – бензиламин, ps – межнуклеотидный фосфотиоатный остаток. Префикс "d" в обозначении дезокси-нуклеотидов опущен.

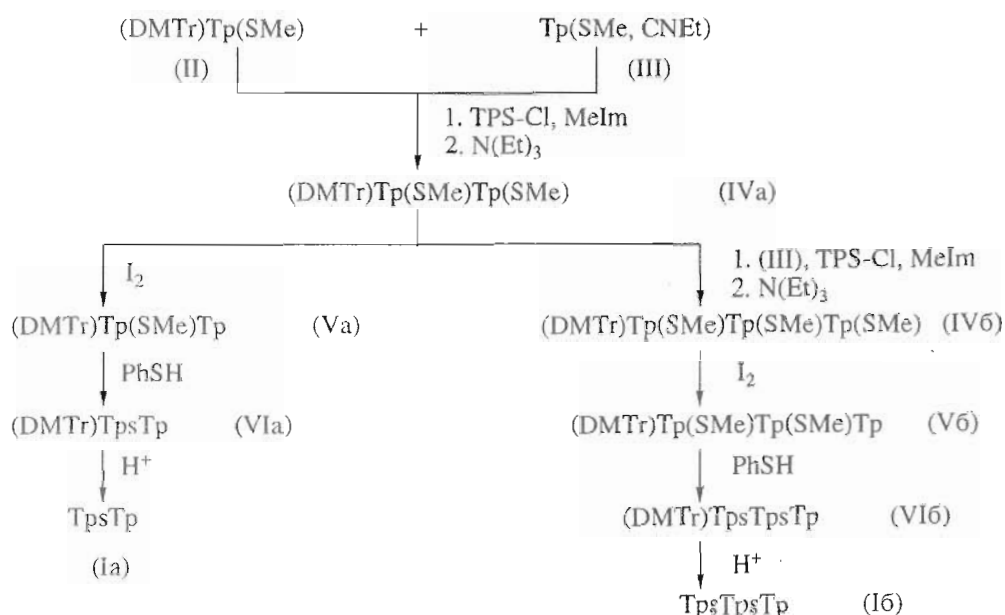
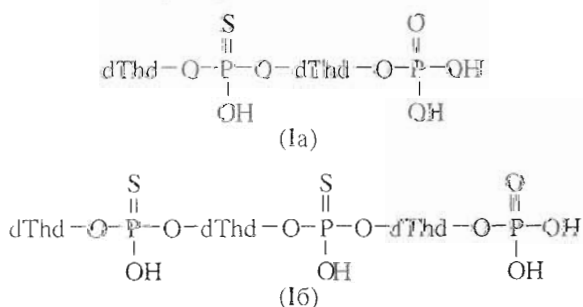


Схема 1.

Возможность применения к ФТАО метода активации концевых фосфатов олигонуклеотидов в присутствии окислительно-восстановительной пары (ОВП) – трифенилфосфин (Ph_3P) – дигиридилдисульфид ($(\text{PyS})_2$) [18], позволяющего манипулировать с уже деблокированными олигонуклеотидами и вводить в их состав, например, различные аминопроизводные [9, 11, 16, 18], неясна из-за относительно высокой нуклеофильности межнуклеотидных фосфотиоатных остатков по сравнению с природными фосфатными группами. Это может привести к модификации фосфотиоатных остатков как самими реакционноспособными группами, вводимыми в состав ФТАО, так и ОВП $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$.

Цель настоящего исследования – изучение возможности применения ОВП $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ для селективной активации концевых фосфатов олигонуклеотидных аналогов, содержащих межнуклеотидные фосфотиоатные группы, а также возможности присоединения различных, в том числе и реакционноспособных, групп по концевым фосфатам ФТАО.

Исследования проводили на модельных ди- и тритимидилдифосфотиоатах (Ia) и (Iб),



содержащих межнуклеотидные фосфотиоатные диэфирные остатки, а на 3'-конце – свободную фосфатную группу.

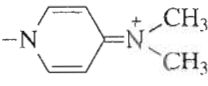
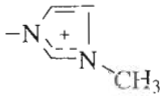
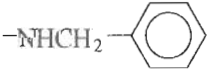
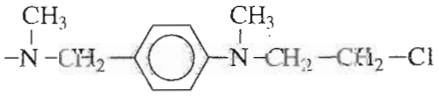
Синтез соединений (Ia) и (Iб) был осуществлен согласно схеме 1.

Вначале по модифицированной триэфирной методике [19] были синтезированы защищенные ди- и тринуклеотидные блоки (IVa) и (IVб), SMe-группу которых с 3'-концевого фосфата избирательно удаляли обработкой иодом [19, 20] (20 экв. I_2 в водном пиридине, 20 мин, 20°C)*.

Далее удаляли метильные остатки с межнуклеотидных SMe-фосфотриэфирных групп обработкой фосфотриэфиров (Va) и (Vб) тиофенолом [23]. После снятия DMTr-защитных групп были получены целевые ди- и тринуклеотидфосфотиоаты (Ia) и (Iб). Они были выделены ионообменной ВЭЖХ с выходом 40 - 60% и охарактеризованы с использованием ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ (см. табл. 1 и 2, а также рис. 1а, 4а и 5а). По данным ионообменной хроматографии (см. табл. 2), полученные фосфотиоаты (Ia) и (Iб) имеют большее время удерживания, чем соответствующие контрольные ди- и тринуклеотиды TpTp и TpTpTp , не содержащие межнуклеотидных фосфотиоатных групп. При обращенно-фазовой ВЭЖХ продукты элюируются в виде смеси диастереомеров, время

* В первые минуты запись ^{31}P -ЯМР-спектра полностью исчезают сигналы в области 18 - 20 м. д., соответствующие концевой фосфодиэфирной SMe-группировке, и появляется сигнал в области +0.7 м. д., соответствующий концевому фосфату [21]. При этом межнуклеотидные SMe-фосфотриэфирные задиты не затрагиваются (сигналы в области 28 - 32 м. д. [19, 22]).

Таблица 1. Значения химических сдвигов ^{31}P исследуемых соединений

Шифр соединений	$(\text{Trps})_n\text{T}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{O}}-\text{P}-\text{X}$		δ , м. д.*	
	n	X	3'-P	ps
(Ia)	1	-OH	-0.26	55.63 56.46
(Iб)	2	»	-0.83 -1.18	55.57 56.19
(VIIa)	1		-7.50 -7.57	55.05 55.35
(VIIб)	2	»	-7.26	55.62 55.84 55.97 56.10
(VIIIa)	1		-11.45 -11.68	55.09 55.53
(VIIIб)	2	»	-11.56	55.27 55.34 55.56 55.92
(IXa)	1	-NH(CH ₂) ₃ NH ₂	7.65 7.90	55.80 56.86
(IXб)	2	»	7.75 7.88	55.67 56.23 56.80 57.27
(Xa)	1		6.37 6.60	55.90 56.59
(XIa)	1		7.34 7.43	56.37 56.73
(XIб)	2	»	7.53 7.67 7.79	55.99 56.56 56.98 57.03

* Химические сдвиги даны относительно 85% H₂PO₄, растворитель - ДМФ.

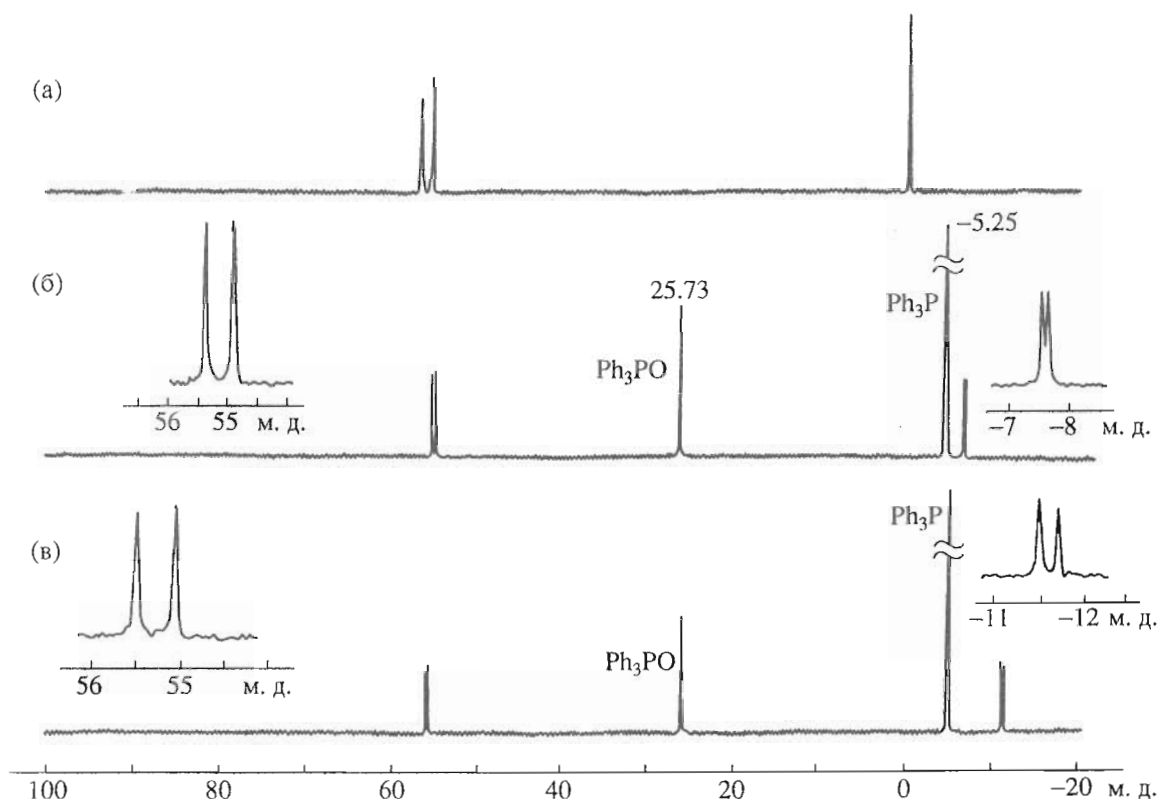


Рис. 1. ^{31}P -ЯМР-спектры исходного TrpTr (Ia) (NHEt_3 -соль, 0.01 М раствор в DMF) (а), реакционной смеси через 4 мин после добавления 10 экв. смеси $(\text{PyS})_2\text{-Ph}_3\text{P}$ (1 : 1) и 20 экв. DMAP (б) или 20 экв. MeIm (в).

удерживания которых больше, чем у соответствующих контрольных ди- или тринуклеотидов TrpTr и TrpTrTr. Эти данные подтверждают структуру ди- и тринуклеотидфосфотиоатов (Ia) и (Iб).

Полученные модельные фосфотиоаты (Ia) и (Iб) содержат концевую фосфатную и межнуклеотидные фосфотиоатные (ps) остатки, которые резко различаются по значениям их химических сдвигов (примерно на 40 - 60 м. д., см. табл. 1) и в силу этого пригодны для исследования методом ^{31}P -ЯМР-спектроскопии возможности селективной активации концевой фосфатной группы ФТАО. В качестве активирующего реагента использовали ОВП $\text{Ph}_3\text{P-(PyS)}_2$ в присутствии DMAP или MeIm (схема 2). За ходом процесса следили при помощи ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, в случае тринуклеотида (Iб) – также методом ионообменной хроматографии.

При взаимодействии фосфотиоатов (Ia) или (Iб) с DMAP или MeIm в DMF в присутствии смеси Ph_3P в $(\text{PyS})_2$, по данным ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, уже в первые минуты записи спектров наблюдается количественное образование DMAP- или MeIm-производных ((VIIa, б) или (VIIIa, б) соответственно). Так, например, при взаимодействии динуклеотида (Ia), имеющего сигналы концевой фосфата (-0.26 м. д. [18, 21]) и сигналы двух стереомеров межнуклеозидфосфотиоатной группы

(δ 55.05 и 55.35 м. д. [7]) (рис. 1а)), с DMAP в присутствии ОВП уже при первой записи спектра ^{31}P -ЯМР (3 - 4 мин) (рис. 1б) видно, что в реакцию вступает только концевой фосфат ФТАО. При этом помимо сигналов, относящихся к Ph_3P (-5.25 м. д.) и Ph_3PO (25.73 м. д.), в спектре регистрируются слабopольные сигналы, характерные для концевой фосфата, несущего остаток DMAP (δ -7.50 и -7.57 м. д. [18]) (рис. 1б) (отнесение здесь и далее по данным работ [7, 18, 22] и обзора [21]).

При взаимодействии ди- или тринуклеотидов (Ia) или (Iб) с MeIm в присутствии смеси Ph_3P и $(\text{PyS})_2$ фиксируется появление сигналов в области -11 м. д. (рис. 1в, табл. 1), характерной для MeIm-фосфамидных производных [18], что соответствует образованию соединений (VIIIa) или (VIIIб) соответственно. Выдерживание реакционных смесей дополнительно в течение 2 ч, после образования соответствующих цвиттер-ионных DMAP- или MeIm-фосфамидных производных, не приводит к появлению в спектрах ^{31}P -ЯМР каких-либо побочных сигналов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что наличие межнуклеозидфосфотиоатных групп не влияет на процесс активации концевой фосфата ФТАО с помощью ОВП $\text{Ph}_3\text{P-(PyS)}_2$ в присутствии DMAP или MeIm. Реакция протекает количественно и быстро с образованием фосфамидной

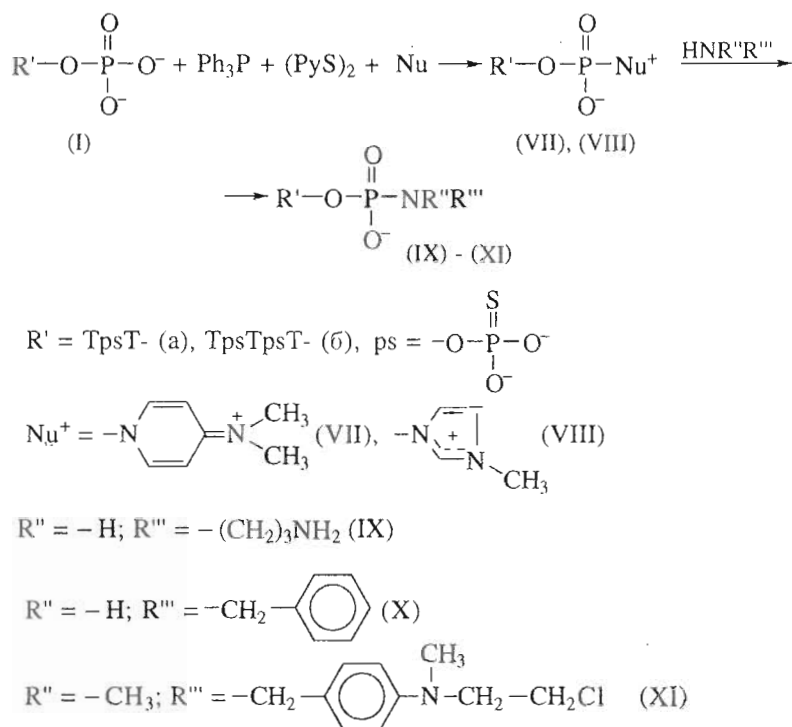


Схема 2.

связи по концевой фосфатной группе фосфотиоата, т.е. с практически количественным превращением фосфотиоатного аналога олигонуклеотида с 3'-концевой фосфатной группой в его 3'-DMAP- или 3'-MeIm-производное.

Исходные ди- и тринуклеотиды из-за наличия в них хиральных фосфотиоатных центров суще-

ствуют в виде смеси диастереомеров (два для ди- (Ia) и четыре для тринуклеотида (Iб)). В связи с этим сигналы ps-групп для (Ia) и (Iб) и для их фосфамидных производных представляют собой несколько близкорасположенных синглетов (например, рис. 1, 2). Из данных табл. 1 видно, что на значение химического сдвига ps-групп оказывает

Таблица 2. Выходы и хроматографические характеристики ди- и тритимидилатов и их производных

Олигонуклеотиды и их производные	Шифр соединений	Выход целевого продукта, %	τ, мин	
			ИОХ*	оф ВЭЖХ*
Диэфирные (кислородсодержащие) производные (контроли)				
TrpTrp	-	-	6.1	9.9
TrpTrpTrp	-	-	12.1	12.4
Исходные 3'-фосфатсодержащие фосфотиоаты				
TrpTrp	(Ia)	60	10.5	10.5; 10.9**
TrpTrpTrp	(Iб)	40	18.5	12.9 - 14.1***
3'-Фосфамидные производные фосфотиоатов				
TrpTrp(DMAP)	(VIIa)	92	-	12.5; 13.0**
TrpTrp(MeIm)	(VIIIa)	91	-	12.3; 12.8**
TrpTrp(NH(CH ₂) ₃ NH ₂)	(IXa)	88	-	14.2; 14.7**
TrpTrp(NHBn)	(Xa)	86	-	19.1; 19.7**
TrpTrp(N(CH ₃)CH ₂ RC ⁺)	(XIa)	82	-	19.9; 20.5**
TrpTrpTrp(DMAP)	(VIIб)	93	6.8	16.9 - 18.5***
TrpTrpTrp(MeIm)	(VIIIб)	90	6.4	16.6 - 18.3***
TrpTrpTrp(NH(CH ₂) ₃ NH ₂)	(IXб)	92	7.4	14.4 - 15.8***
TrpTrpTrp(NHBn)	(Xб)	87	9.8	18.9 - 20.5***
TrpTrpTrp(N(CH ₃)CH ₂ RCI)	(XIб)	85	9.5	20.7 - 21.9***

* Условия см. "Экспериментальную часть".

** Два диастереомера.

*** Смесь диастереомеров.

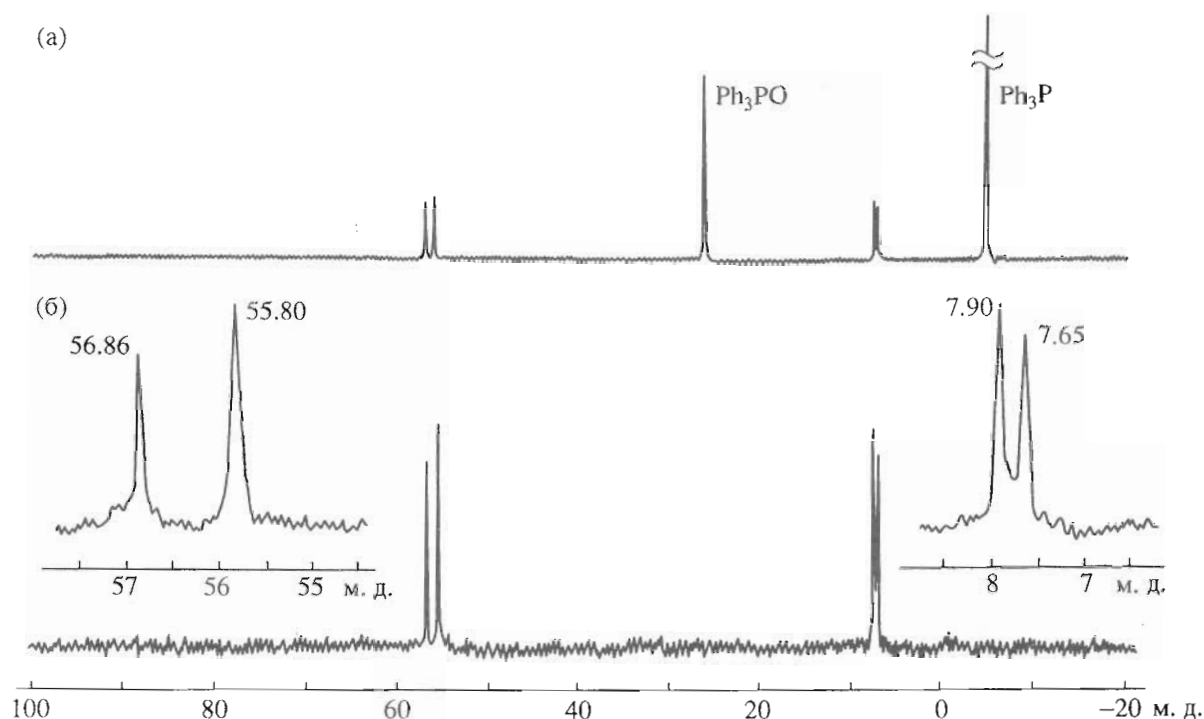


Рис. 2. ^{31}P -ЯМР-спектры реакционных смесей при получении фосфамидного производного $\text{TrpTr}(\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2)$ (VIIa). TrpTr (Ia) (NH_4Et_3 -соль, 0.01 М раствор в DMF) выдерживали со смесью 10 экв. $(\text{PyS})_2$, 10 экв. Ph_3P и 20 экв. DMAP в течение 10 мин и добавляли 20 экв. $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$. Через 5 мин снимали спектр (а), выдерживали дополнительно 2 ч, осаждали реакционную смесь эфиром, растворяли осадок в 1.2 мл DMF и записывали спектр (б).

влияние заместитель, введенный по концевому фосфату. Наличие остатков различных аминов по концевому фосфату приводит также к появлению двух сигналов, соответствующих самим 3'-концевым фосфатным группам, что, вероятно, обусловлено разным (но по величине мало отличающимся) влиянием rs -групп различных диастереомеров на химические сдвиги концевых (нехиральных) 3'-фосфамидных остатков (рис. 1, 2, табл. 1). Аналогичное появление двух сигналов дизамещенных концевых фосфатных групп ранее было зарегистрировано в случае фосфамидных производных природных олигонуклеотидов [24].

Фосфамиды (VIIa, б) и (VIIIa, б) были выделены из реакционных смесей осаждением эфиром. В спектрах ^{31}P -ЯМР, записанных через 2 ч после растворения осажденных продуктов (VIIa, б), (VIIIa, б) в DMF, практически не регистрируется никаких побочных сигналов, кроме сигналов, относящихся к соответствующим межнуклеозидфосфотиоатным (область 55 - 57 м. д.) и DMAP- (область -7 ... -8 м. д.) или MeIm-фосфамидным (область -11 ... -12 м. д.) остаткам (см. табл. 1). Эти данные свидетельствуют об относительной устойчивости в DMF межнуклеозидфосфотиоатных групп, которые не подвергаются модификации не только при воздействии на них ОВП $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ в процессе синтеза производных ФТАО, но и при воздействии на них самих DMAP- или MeIm-фос-

фамидных активных групп, образованных с участием концевого фосфата.

Далее была исследована возможность замещения реакционноспособных цвиттер-ионных 3'-концевых фосфамидных DMAP- и MeIm-группировок различными нуклеофилами, содержащими первичные или вторичные аминогруппы (например, пропилендиамином или бензиламином).

Сначала указанное замещение осуществляли без предварительного выделения активных DMAP- или MeIm-производных. С этой целью активацию 3'-концевых фосфатов фосфотиоатов (Ia) или (Iб) осуществляли 10 экв. ОВП в присутствии 20 экв. DMAP или MeIm в течение 10 - 20 мин, фиксировали по данным ^{31}P -ЯМР-спектроскопии образование активного DMAP- или MeIm-производного и далее добавляли в реакционную смесь 10 - 20 экв. соответствующего амина. В случае использования пропилендиамина реакции замещения протекали без образования каких-либо побочных продуктов и завершались уже в первые 3 - 5 мин с практически количественным образованием соответствующих фосфамидов (IXa) или (IXб) (см., например, рис. 2а).

При взаимодействии ди- или тринуклеотида (Ia) или (Iб) с бензиламином реакции замещения также завершались в течение 5 - 10 мин после добавления амина в реакционную смесь, однако уже

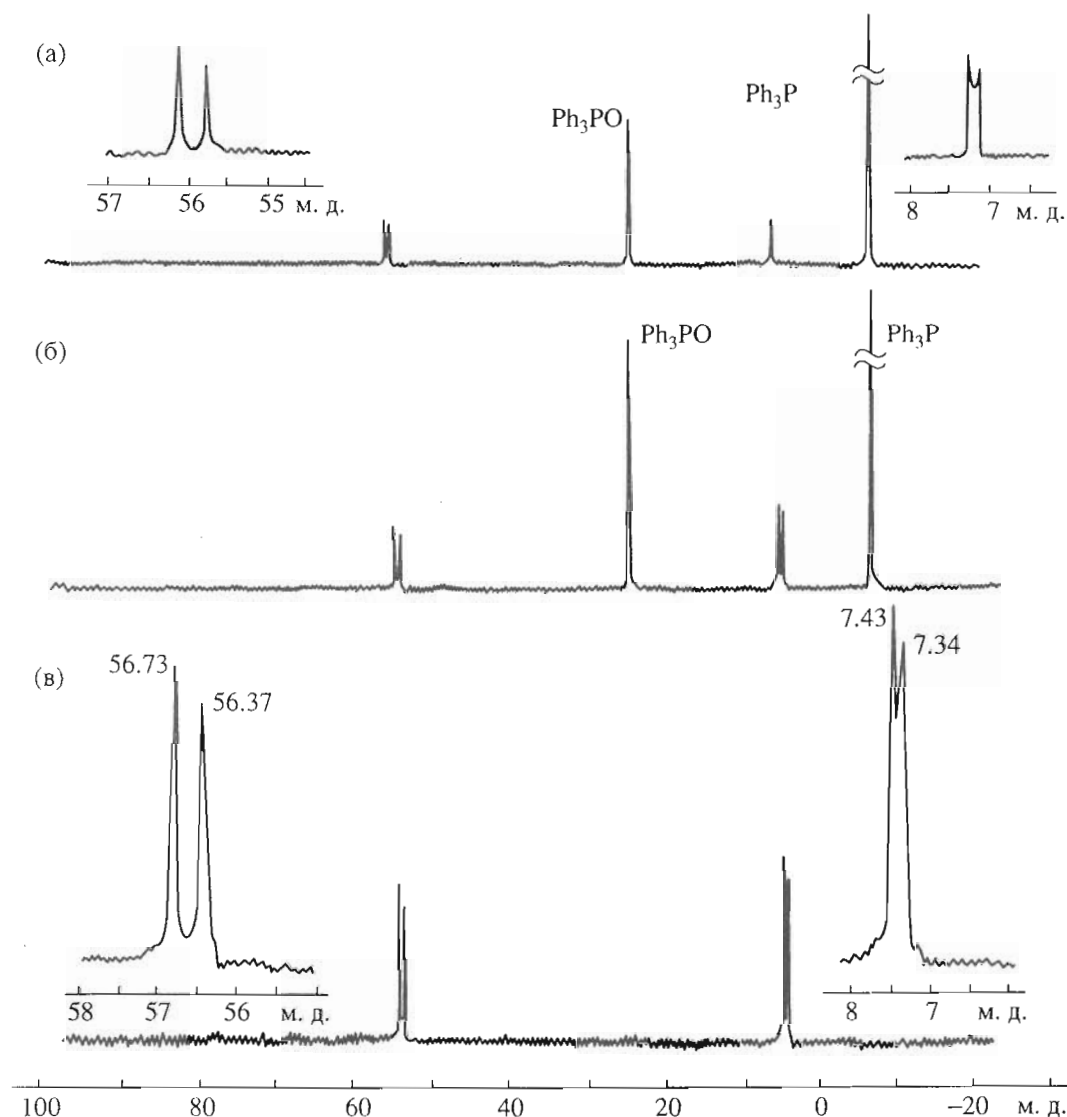


Рис. 3. ^{31}P -ЯМР-спектры реакционных смесей при получении алкилирующего производного $\text{TrpTr}(\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{RCl})$ (XIa). TrpTr (Ia) (NHEt_3 -соль, 0.01 M раствор в DMF) выдерживали со смесью 10 экв. $(\text{PyS})_2$, 10 экв. Ph_3P и 20 экв. MeIm в течение 10 мин, добавляли 10 экв. $\text{NH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{RCl}$ и записывали спектр через 6 мин (а) и 2 ч (б). Через 2.5 ч полученную реакционную смесь осаждали эфиром, растворяли осадок в 1.2 мл DMF, выдерживали раствор в течение 2 ч и записывали спектр (в).

через 30 - 40 мин в спектрах ^{31}P -ЯМР наблюдалось появление побочных сигналов в области 42 и -0.6 м. д., интенсивность которых (по отношению к интенсивности сигналов 3'-концевой фосфамидной группы) со временем растет и уже через 1.5 ч составляет 24 и 29% соответственно. Образование побочных продуктов при реакции с пропилендиамином не наблюдается ни в первые минуты, ни по истечении 2 - 3 ч (рис. 2б). Для выяснения структуры и природы побочных продуктов, получаемых при реакции с бензиламином, необходимы дополнительные эксперименты. В рамках же данной работы мы нашли другой вариант получения фосфамидов ФТАО, не дающий побочных продуктов.

Для этого DMAP- или MeIm-производные ФТАО были предварительно выделены из реакционных смесей осаждением эфиром, а затем использованы в реакции с теми же аминами. После добавления 20 экв. этих аминов к выделенным соединениям (VIIa, б) или (VIIIa, б) в DMF уже в первые минуты в спектрах ^{31}P -ЯМР регистрируются сигналы соответствующих фосфамидов (IXa, б) и (Xa, б) (см. табл. 1). Появление каких-либо побочных сигналов в спектрах ^{31}P -ЯМР при выдерживании в течение 2 ч в этом случае не фиксируется.

Таким образом, установлено, что бензиламидные производные ФТАО могут быть легко получены из предварительно выделенных DMAP- или MeIm-производных ФТАО.

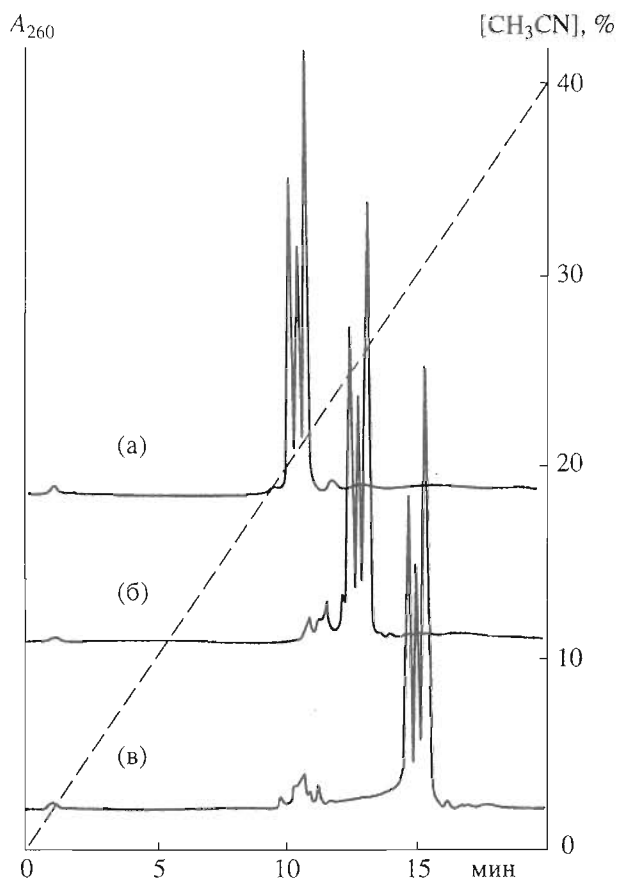


Рис. 4. Профили обращенно-фазовой ВЭЖХ реакционных смесей, содержащих исходный фосфотиоат TrpTrpTrp (Iб) (а), TrpTrpTrp(DMAP) (VIIб) (б) и алкилирующее производное TrpTrpTrp(N(CH₃)CH₂RCl) (XIб) (в). Условия хроматографии приведены в "Экспериментальной части".

Известно, что межнуклеотидные фосфотиоатные группы в водно-органических средах легко подвергаются воздействию алкилирующих реагентов [25, 26]. В связи с этим важно было выяснить возможность введения в состав ФТАО широко используемого для модификации НК-мишеней алкилирующего N-метил-4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензиламина, так, чтобы исключить возможность повреждения межнуклеотидных фосфотиоатных групп под воздействием самой алкилирующей группировки и потерю реакционной способности алкилирующей части исходного амина.

С этой целью была исследована реакция взаимодействия DMAP- или MeIm-производных ди- и тринуклеотидов (Iа) и (Iб) с избытком алкилирующего N-метил-4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензиламина. Контроль за ходом реакции проводили методом ³¹P-ЯМР-спектроскопии. Было обнаружено, что при использовании 10 экв. алкилирующего амина в реакции с выделенными соединениями (VIIа, б) или (VIIIа, б) в DMF образование со-

ответствующих алкилирующих фосфамидов (XIа) или (XIб) завершается количественно в течение уже 10 мин. Образование побочных продуктов при этом не наблюдается. Дополнительное выдерживание реакционных смесей, содержащих алкилирующие производные фосфотиоатов (XIа) и (XIб), в течение по крайней мере 2 ч также не приводит к образованию каких-либо побочных продуктов*. Аналогичные результаты были получены при синтезе алкилирующих производных в присутствии ОВП без дополнительного выделения активных DMAP- или MeIm-производных фосфотиоатов (см., например, рис. 3).

Алкилирующие производные фосфотиоатов (XIа) и (XIб) выделяли из реакционных смесей осаждением эфиром и охарактеризовали данными ³¹P-ЯМР-спектроскопии, ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ. В спектрах ³¹P-ЯМР, записанных через 2 ч после растворения осажденных продуктов (XIа) и (XIб) в DMF, практически не регистрируются какие-либо побочные сигналы (рис. 3в). Эти данные свидетельствуют об относительной устойчивости межнуклеозид-фосфотиоатных групп в присутствии алкилирующего амина.

Далее мы проверили сохранность RCl-групп в полученных фосфамидных производных фосфотиоатов (XIа) и (XIб) по реакции алкилирования этилендиамина (1 М водный раствор) [27]. Активность RCl-групп в синтезированных соединениях (XIа) и (XIб) составляла 85 - 90%.

Сохранность межнуклеотидных фосфотиоатных групп в полученных алкилирующих (XIа) и (XIб) и других производных фосфотиоатов (IX), (X) была дополнительно подтверждена хроматографическими данными. Как видно из рис. 4а - в, при обращенно-фазовой ВЭЖХ исходный ФТАО и полученные фосфамидные производные элюируются в виде нескольких близкорасположенных хроматографических пиков, обусловленных существованием исследуемых соединений в виде смеси диастереомеров. Время выхода с колонки у них разное и коррелирует с гидрофобностью хроматографируемого соединения (рис. 4 и табл. 2). Фосфамидная природа 3'-концевого остатка в соединениях (IX) - (XII) подтверждена данными их кислотного гидролиза [28]: в условиях гидролиза они практически количественно превращаются в исходный ди- или тринуклеозидфосфотиоат (Iа) или (Iб) и производное соответствующего амина (рис. 5в). Анализ кислотного гидролизата фосфамидных производных фосфотиоатов ионообменной хроматографией позволяет также подтвердить сохранность межнуклеозидфосфотиоатных

* В случае алкилирования межнуклеотидных фосфотиоатных групп остатком алкилирующего амина должны были бы появиться ³¹P-ЯМР-сигналы в области 28 - 30 м. д. (триэфирные фосфотиоаты (RO)(RO)P(O)(RS) [19, 22]).

остатков в ходе синтеза, поскольку при хроматографии на сильных анионообменниках подвижности кислородных и фосфотиоатных аналогов олигонуклеотидов сильно отличаются друг от друга [29, 30] (табл. 2).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности получения предложенным методом различных фосфамидных, в том числе алкилирующих, производных ФТАО с использованием ОВП $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$. Реакции при этом проходят количественно и гладко без образования каких-либо побочных продуктов. При проведении реакции в DMF межнуклеотидные фосфотиоатные остатки ФТАО не подвергаются алкилированию ни самим алкилирующим амином из реакционной смеси, ни алкилирующей группировкой, входящей в состав производного ФТАО, а активность RCl-групп в полученных соединениях сохраняется.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы защищенные нуклеозиды, 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид – отечественного производства, N-метилимидазол (Serva, ФРГ), тиофенол (Fluka, Швейцария), 4-диметиламинопиридин (Merck, Германия), трифенилфосфин (Chemapol, ЧСФР), 2,2'-дипиридилдисульфид (Sigma, США), пропилендиамин и бензиламин (Merck, Германия). N-Метил-4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензиламин (гидрохлорид) любезно предоставлен Т.М. Ивановой (НИБХ СО РАН).

Колончатую хроматографию проводили на силикагеле L40/100 (Chemapol, ЧСФР), ионообменную – на смоле Полисил СА отечественного производства (колонка 4.6×250 мм) в градиенте концентрации KH_2PO_4 (0 → 0.2 М за 40 мин) в 20% CH_3CN при скорости элюции 2 мл/мин; обращенно-фазовую – на смоле Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ) (колонка 4.6×250 мм) в градиенте концентрации CH_3CN (0 → 50% за 50 мин (см. табл. 2) или 0 → 80% за 40 мин (см. рис. 4) в 0.05 М LiClO_4 при скорости элюции 2 мл/мин; ВЭЖХ – с использованием хроматографов Waters (США), ТСХ – на пластинках Kieselgel F 60 254 (Merck, Германия).

Спектры ^{31}P -ЯМР снимали на спектрометре AC-200 (Brucker, Германия) при 25°C. Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно 85% H_3PO_4 .

Выходы и характеристики синтезированных соединений приведены в табл. 1, 2.

(DMTr)Tp(SMe)Tp(SMe) (IVa) и (DMTr)Tp(SMe)Tp(SMe)Tp(SMe) (IVб) были синтезированы по модифицированному триэфирному методу в растворе [19] с использованием в качестве Р-компонентов – (DMTr)Tp(SMe) (II), ОН-компонентов – Tp(SMe, CNEt) (III), а в качестве конденсирующего реагента – смеси TPS-Cl и

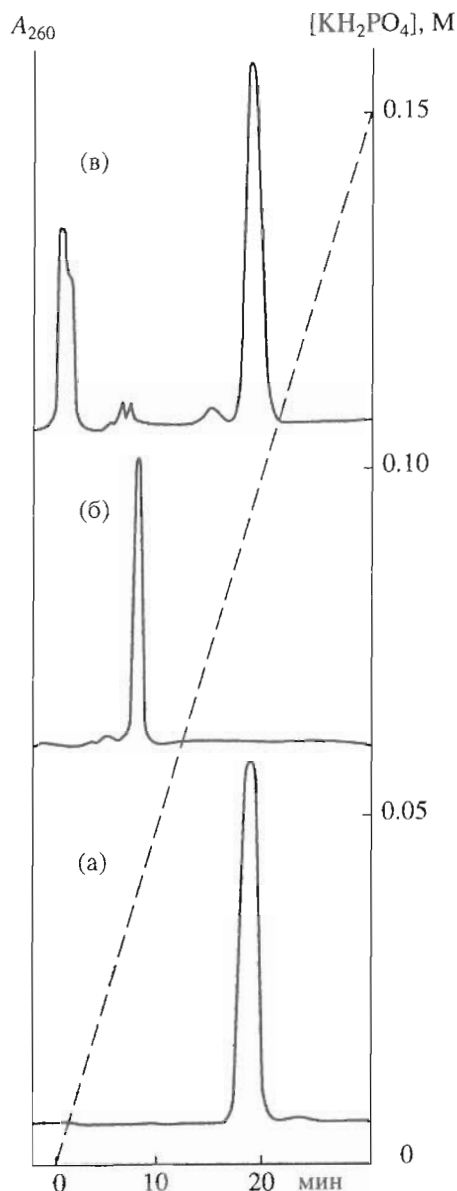


Рис. 5. Профили ионообменной хроматографии исходного фосфотиоата TpsTpsTp (I6) (а), его алкилирующего производного TpsTpsTp(N(CH₃)CH₂RCl) (XI6) (б) и кислотного гидролизата (XI6) (0.1 н. HCl, 40°C, 2 ч) (в). Условия хроматографии приведены в "Экспериментальной части".

N-метилимидазола в абсолютном пиридине. Выходы продуктов (IVa) и (IVб) (по данным ЯМР) 92 и 85% соответственно. ^{31}P -ЯМР (Py – H₂O, 4 : 1): (IVa) – δ 31.3 и 20.1 м. д. (соотношение интенсивностей сигналов 1 : 1), (IVб) – δ_1 30.7; 30.9 и δ_2 18.9 м. д. (соотношение интенсивностей сигналов $\delta_1/\delta_2 = 2 : 1$).

(DMTr)Tp(SMe)Tp (Va) и (DMTr)Tp(SMe)Tp(SMe)Tp (Vб). 0.1 ммоль (IVa) или (IVб) обрабатывали 2 ммоль иода в 2 мл смеси пиридина с водой (4 : 1). Через 20 мин реакционную смесь разбавляли 10 мл воды и избыток иода удаляли экстракцией эфиром (3 × 20 мл).

Водный слой упаривали, растворяли в 5 мл метанола и осаждали 50 мл эфира. Осадок отделяли и сушили над P_2O_5 в вакууме и далее без дополнительной обработки использовали для получения соединений (Ia) и (Iб). ^{31}P -ЯМР ($Py - H_2O$, 4 : 1): (Va) – δ 31.3 и 0.7 м. д. (соотношение интенсивностей сигналов 1 : 1), (Vб) – δ_1 30.6; 31.0 и δ_2 0.7 м. д. (соотношение интенсивностей сигналов $\delta_1/\delta_2 = 2 : 1$).

ТрпсТр (Ia) и ТрпсТрпсТр (Iб). Соединения (Va) и (Vб) обрабатывали раствором тиофенола (3 мл) в смеси абсолютных растворителей – диоксана (6 мл) с триэтиламином (3 мл). По данным ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, через 40 ч наблюдается полное деблокирование метильных остатков (исчезновение сигналов в области 30 - 32 м. д., $t_{1/2} = 7.5$ ч при 20°C) и образование межнуклеотидных диэфирных фосфотиоатных групп (сигналы в области 55 - 57 м. д.). При этом наблюдается также частичный разрыв межнуклеотидных связей (сигналы в области 16 - 18 м. д.). Выход образуемых при этом промежуточных фосфотиоатов (VIa) и (VIб) (схема 1), по данным ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, составляет 85 и 72% соответственно. Далее реакцию смесь, полученную после обработки тиофенолом, осаждали 300 мл эфира и осадок растворяли в 10 мл 80% уксусной кислоты, через 20 мин упаривали, остатки уксусной кислоты удаляли двукратным упариванием с водой. Целевые фосфотиоаты (Ia) и (Iб) выделяли ионообменной хроматографией в вышеприведенных условиях, собирая фракции с наибольшим временем удерживания (основной продукт), затем обессоливали на обращенно-фазовой колонке, элюируя продукты 50% водным CH_3CN , содержащим 0.1 М триэтиламмоний-ацетат. Выходы конечных соединений (Ia) и (Iб) составляли 60 и 40% соответственно. Продукты гомогенны по данным ионообменной хроматографии.

Контрольные ди- и тритимидилаты ТрТр и ТрТрТр получали деблокированием соответствующих защищенных ди- и тринуклеотидов (IVa) и (IVб) по методу [19].

ТрпсТр(DMAP) (VIIa), ТрпсТр(MeIm) (VIIIa), ТрпсТрпсТр(DMAP) (VIIб), ТрпсТрпсТр(MeIm) (VIIIб). 0.01 ммоль триэтиламмониевой соли ТрпсТр (Ia) или ТрпсТрпсТр (Iб) растворяли в 1 мл абсолютного DMF и добавляли 0.2 ммоль DMAP или 0.2 ммоль MeIm, 0.1 ммоль $(PyS)_2$ и 0.1 ммоль Ph_3P . Через 20 мин реакционные смеси осаждали 50 мл эфира. Продукты растворяли в 1 мл DMF и снова осаждали эфиром. Осадки промывали эфиром и высушивали. Продукты гомогенны, по данным ионообменной хроматографии, и имеют меньшее время удерживания, чем соответствующие исходные фосфотиоаты (Ia) и (Iб).

ТрпсТр($NH(CH_2)_3NH_2$) (IXa),

ТрпсТрпсТр($NH(CH_2)_3NH_2$) (IXб),

ТрпсТр($N(CH_3)CH_2RCl$) (XIa),

ТрпсТрпсТр($N(CH_3)CH_2RCl$) (XIб). К производному (VIIIa) или (VIIIб), полученному в результате взаи-

модействия 0.01 ммоль ТрпсТр (Ia) или ТрпсТрпсТр (Iб) с 0.1 ммоль $(PyS)_2$, 0.1 ммоль Ph_3P и 0.2 ммоль MeIm в 1.2 мл DMF в течение 20 мин, добавляли 0.1 ммоль пропилендиамин или алкилирующего N-метил-4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензиламина. Через 20 мин (контроль ^{31}P -ЯМР) продукты осаждали 50 мл эфира, дважды переосаждали из DMF эфиром и высушивали. Кислотный гидролиз полученных соединений (IX) - (XI) проводили 0.1 М HCl при 40°C в течение 1 - 2 ч. Превращение продуктов контролировали ионообменной хроматографией (рис. 5в). Реакционная способность алкилирующих производных фосфотиоатов, охарактеризованная в реакции с этилендиамином [27], составила 85 - 90%.

Алкилирующий амин в виде основания, используемый для синтеза алкилирующих амидов (XIa) и (XIб), предварительно получали добавлением к раствору дихлоргидрата амина в DMF (100 мкл) 2 - 3-кратного мольного избытка триэтиламина. Осадок триэтиламмонийхлорида отделяли центрифугированием и маточный раствор алкилирующего амина в DMF использовали в реакции.

ТрпсТрпс($NHCH_2Bn$) (Xa), ТрпсТрпсТрпс($NHCH_2Bn$) (Xб). 0.01 ммоль ТрпсТр(DMAP) (VIIa) или ТрпсТрпсТр(DMAP) (VIIб) растворяли в 1.2 мл DMF, добавляли 0.1 ммоль бензиламина. Через 20 мин реакционную смесь осаждали эфиром. Кислотный гидролиз проводили так, как описано выше.

Работа финансировалась в рамках Государственной научно-технической программы (ГНТП) по теме "Новейшие методы биоинженерии. Геннаправленные биологически активные вещества" и частично грантом МНТП "Биотехнология", № ЗН-142-94.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agrawal S., Goodchild J., Civeira M.P., Thornton A.H., Sarin P.S., Zamecnik P.C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 19. P. 7079 - 7083.
2. Matsukura M., Zon G., Shinozuka K., Stein C.A., Mitsuya H., Cohen J.S., Broder S. // Gene. 1988. V. 72. № 1 - 2. P. 343 - 347.
3. Matsukura M., Zon G., Shinozuka K., Robert-Guroff M., Shimada T., Stein C.A., Mitsuya H., Wong-Staal F., Cohen J.S., Broder S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 4244 - 4249.
4. Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression. Topics in Molecular and Structural Biology. V. 12. / Ed. Cohen J.S. L: The Macmillan Press Ltd, 1989.
5. Uhlmann E., Peyman A. // Chem. Revs. 1990. V. 90. № 4. P. 543 - 584.
6. Eckstein F. // Ann. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 367 - 402.
7. Stein C.A., Subasinghe C., Shinozuka K., Cohen J.S. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 8. P. 3209 - 3221.

8. Asseline U., Delarue M., Lancelot G., Toulme F., Thuong N.T., Montennay-Garestier T., Helene C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 11. P. 3297 - 3301.
9. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911 - 920.
10. Stein C.A., Mori K., Loke S.L., Subasinghe C., Shinozuka K., Cohen J.S., Neckers L.M. // Gene. 1988. V. 72. № 1 - 2. P. 333 - 341.
11. Boutorin A.S., Gus'kova L.V., Ivanova E.M., Kobetz N.D., Zarytova V.F., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V.V. // FEBS Lett. 1989. V. 254. № 1, 2. P. 129 - 132.
12. Stein C.A., Pal R., DeVico A.L., Hoke G., Mumbauer S., Kinstler O., Sarngadharan M.G., Letsinger R.L. // Biochemistry. 1991. V. 30. № 9. P. 2439 - 2444.
13. Letsinger R.L., Zngang G., Sun D.K., Ikeuchi T., Sarin P.S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 17. P. 6553 - 6556.
14. Letsinger R.L., Alul R.A., Farooqui F., Gryaznov S.M., Kinstler O. // Nucl. Acids Sympos. Ser. 1991. № 24. P. 75 - 78.
15. MacKellar C., Graham D., Will D.W., Burgess S., Brown T. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 13. P. 3411 - 3417.
16. Кнорре Д.Г., Зарытова В.Ф., Бадашкеева А.Г., Федорова О.С. // Итоги науки и техники. Серия "Биотехнология". 1991. Т. 37. С. 9 - 112.
17. Byrn S.R., Carlson D.V., Chen J.K., Cushman M.S., Goldman M.E., Ma W.P., Pidgeon C.L., Ray K.A., Stowell J.G., Weith H.L. // Adv. Drug Delivery Revs. 1991. V. 6. P. 287 - 308.
18. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Халимская Л.М. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475 - 481.
19. Кумарев В.П., Баранова Л.В., Богачев В.С., Лебедев А.В., Обухова Л.В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 10. С. 1348 - 1358.
20. Амирханов Н.В., Кумарев В.П., Ривкин М.И., Рыбаков В.Н. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 1. С. 126 - 129.
21. Лебедев А.В., Резвухин А.Н. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 2. С. 149 - 185.
22. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 259 - 266.
23. Dahl B.H., Bjergarde K., Nielsen J., Dahl O. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 24. P. 3489 - 3492.
24. Бадашкеева А.Г., Зарытова В.Ф., Кнорре Д.Г., Лебедев А.В., Шубина Т.Н. // Докл. АН СССР. 1975. Т. 222. № 1. С. 97 - 100.
25. Fidanza J.A., McLaughlin L.W. // J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 25. P. 9117 - 9119.
26. Hodges R.R., Conway N.E., McLaughlin L.W. // Biochemistry. 1989. V. 28. № 1. P. 261 - 267.
27. Зарытова В.Ф., Кнорре Д.Г., Курбатов В.А., Лебедев А.В., Самуков В.В., Шишкин Г.В. // Биоорган. химия. 1975. Т. 1. № 6. С. 793 - 799.
28. Мишенина Г.Ф., Самуков В.В., Шубина Т.Н. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 6. С. 886 - 894.
29. Metelev V., Agrawal S. // Anal. Biochem. 1992. V. 200. № 2. P. 342 - 346.
30. Agrawal S., Tang J.Y., Brown D.M. // J. Chromatogr. 1990. V. 509. P. 396 - 399.

Reactive Derivatives of Phosphorothioate Oligonucleotide Analogs.

Part I: Selective Activation of Terminal Phosphates and Preparation of Phosphamide Derivatives of Phosphorothioate Oligonucleotide Analogs

N. V. Amirkhanov and V. F. Zarytova

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

Abstract – Selective activation of the terminal phosphates of oligonucleotide analogs containing internucleotide phosphorothioate groups was carried out using the triphenylphosphine–dipyridyldisulfide reducing–oxidizing pair. This formed the basis for a new method of synthesizing various derivatives of phosphorothioate oligonucleotide analogs. Using this method, zwitterionic 3'-phosphamide derivatives of di- and trinucleotide phosphorothioates TpsTp and TpsTpsTp containing the 4-dimethylaminopyridine or N-methylimidazole residues were synthesized. The derivatives reacted almost quantitatively with amines to form, within 5 - 10 min, the corresponding 3'-phosphamides without cleavage of the internucleotide phosphorothioate groups. Alkylating derivatives of phosphorothioates TpsTp(N(CH₃)CH₂RCl) and TpsTpsTp(N(CH₃)CH₂RCl) (RCl = –C₆H₄N(CH₃)CH₂CH₂Cl) were also synthesized by the proposed method. The internucleotide phosphorothioate residues of the oligonucleotide analogs were stable during the synthesis in DMF. The activity of the alkylating RCl groups in the synthesized compounds was maintained at 85 - 90%.

Key words: phosphorothioate analogs, oligonucleotides, triphenylphosphine–dipyridyldisulfide, 3'-phosphamide, ³¹P NMR.