



УДК 547.963.32.057:547.92:547.835.1

ОЛИГО(2'-О-МЕТИЛРИБОНУКЛЕОТИДЫ) И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ. II*. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ОЛИГО(2'-О-МЕТИЛРИБОНУКЛЕОТИДОВ) С N-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)ФЕНАЗИНИЕВЫМИ И СТЕРОИДНЫМИ ГРУППИРОВКАМИ НА 5'-КОНЦЕ

© 1996 г. З. А. Сергеева, С. Г. Лохов, А. Г. Веньямина[#]Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 06.03.96 г.

Синтезированы олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды), несущие на 5'-концевом фосфате остаток полициклического ароматического красителя N-(2-гидроксиэтил)феназиния или остаток стероида (холестерин или тестостерон). Показано, что введение N-(2-гидроксиэтил)феназиниевой группировки в окта(2'-О-метилрибонуклеотид) повышает температуру плавления дуплекса с d-мишенью на 9°C. Остаток стероида, введенный через фосфодифирную связь в 5'-положение дека (2'-О-метилуридилата), увеличивает стабильность комплексов стероидных конъюгатов с d(pA)₁₆ и (pA)₁₆, причем для производного холестерина этот эффект выражен сильнее ($\Delta T_{пл} = 5$ и 8°C соответственно), чем в случае тестостерона ($\Delta T_{пл} = 1$ и 4°C).

Ключевые слова: олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды), производные олигонуклеотидов, химический синтез, термостабильность дуплексов.

В последние годы резко возрос интерес исследователей к олиго(2'-О-метилрибонуклеотидам) – аналогам природных РНК, обладающим рядом интересных химических и биологических свойств. Они устойчивы в широком диапазоне изменений pH и при действии клеточных РНК- или ДНК-специфичных нуклеаз [2]. Эти аналоги образуют стабильные дуплексы с фрагментами РНК и ДНК, причем дуплекс олиго(2'-О-метилрибонуклеотид)–РНК более термически стабилен, чем соответствующий дуплекс олигодезоксирибонуклеотид–РНК, и не расщепляется РНКазой H [3]. В работах [4, 5] показано, что олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды) способны образовывать триплексы с двухцепочечной ДНК, превосходящие по стабильности ДНК-триплексы. Благодаря этому комплексу полезных свойств 2'-О-метил-аналоги олигорибонуклеотидов в настоящее время нашли широкое применение в качестве антисенс-реагентов для решения различных задач молекулярной биологии и биохимии (см. обзор [2]).

Ковалентное присоединение к олигонуклеотидам группировок различной химической природы

* Сообщение I см. [1].

Сокращения: N^m – 2'-О-метилрибонуклеозид, PivCl – пивалоилхлорид, Py – пиридин, Php – остаток 2-(N-(2-гидроксиэтил)феназиния, Chol-OH – холестерин, Test-OH – тестостерон.

[#] Автор для переписки (тел.: 39-62-75; факс: 35-16-65; e-mail: ven@modul.bioch.nsk.su).

придает им новые свойства, полезные для использования в качестве ген-направленных соединений *in vitro* и *in vivo*. Известно, например, что гидрофобные группировки улучшают связывание синтетических олигонуклеотидов с мембранами и их проникновение в клетки, а введение в молекулу олигонуклеотида остатков полициклических ароматических красителей улучшает их комплексообразующие свойства [6]. Немаловажно и то, что модификация олигонуклеотидов по 5'- и 3'-концам уменьшает степень их деградации в клетках [7]. Для производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) к настоящему моменту времени описан синтез и исследование в различных биологических системах их конъюгатов с тиохолестерином, холевой кислотой, некоторыми репортерными группами [2, 8, 9]. Получение новых производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) и изучение их свойств сегодня является одной из актуальных задач биоорганической химии и молекулярной биологии.

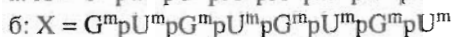
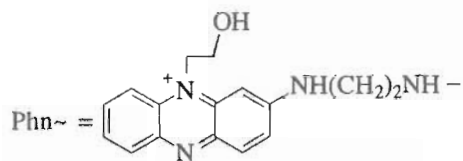
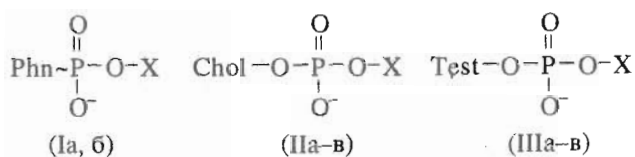
Данная статья посвящена синтезу олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов), несущих на 5'-конце остаток полициклического ароматического красителя N-(2-гидроксиэтил)феназиния (соединения (Ia, б)) или стероидные группировки (на примере холестерина и тестостерона) (соединения (IIa) и (IIIa)), а также изучению термической стабильности дуплексов с участием полученных конъюгатов.

Для синтеза рибонуклеозидов, содержащих 2'-О-метильную группу, известно несколько способов, основанных на различных сочетаниях защитных групп и метилирующих агентов [2]. Мы использовали предложенный в 1982 г. [10] метод монометилирования 2',3'-*цис*-диолевой группировки N,5'-О-защищенных рибонуклеозидов диазометаном в присутствии хлорида олова с некоторыми нашими модификациями. Этот способ, имеющий минимальное количество стадий и не требующий дорогостоящих реагентов, в то же время достаточно универсален и позволяет с хорошим выходом получать все четыре защищенных 2'-О-метилированных рибонуклеозида. Хотя в результате реакции получается смесь 2'- и 3'-О-метилированных рибонуклеозидов, в ней преобладает 2'-изомер (в нашем случае ~70% для пиримидиновых и ~60% для пуриновых рибонуклеозидов), который удается выделить с помощью хроматографии на силикагеле. Структуру синтезированных 2'- и 3'-О-метильных изомеров защищенных рибонуклеозидов доказывали с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии, основываясь на различии для них химических сдвигов протонов Н-1' и -ОСН₃-группы [10]. Полученные 2'-О-метил-5'-О-диметокситрипиримидиноиды обработкой триимидазолидом фосфора с последующим гидролизом превращали в Н-фосфонатные блоки для олигонуклеотидного синтеза.

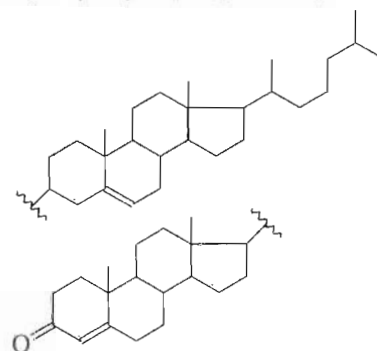
Синтез олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) был выполнен Н-фосфонатным твердофазным методом, известные преимущества которого позволяют быстро и с достаточно высоким выходом получать олигонуклеотиды средней длины [11, 12]. После выполнения необходимого числа синтетических циклов и удаления 5'-концевой диметокситрипиримидиновой группы в случае синтеза 5'-фосфатов проводили обработку защищенного олигонуклеотида, присоединенного к носителю, β-цианэтилфосфитом в условиях, описанных нами ранее [13]. После окисления и деблокирования в стандартных условиях олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды) или их 5'-фосфаты выделяли ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией.

При конструировании олигонуклеотидных производных весьма важен выбор такого положения в структуре олигонуклеотида, модификация которого не влияла бы на способность соединения к специфическим комплементарным взаимодействиям. Одним из таких положений является терминальный фосфат, который легко может быть активирован для последующего взаимодействия с функциональными группами различных лигандов.

N-(2-Гидроксиэтил)феназиниевую группировку присоединяли к 5'-фосфату незащищенных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) по аналогии с синтезом для производных дезоксирибозы [14]. Используя окислительно-восстановительную па-



Chol:-



Test:-



a: X = U^m(pU^m)₉

б: X = U(pU)₉

d: X = d(T(pT))₉

ру трифенилфосфин-дипиридилдисульфид в качестве конденсирующего реагента в присутствии диметиламинопиридина как нуклеофильного катализатора, получали олигонуклеотид, несущий на 5'-конце алифатический аминолинкер. Затем проводили характерную для четвертичных солей феназина реакцию окислительного присоединения аминов по второму положению гетероциклической системы красителя в щелочной среде.

Соединения (Ia), (Iб) были выделены с выходом около 80%; наличие в них остатка N-(2-гидроксиэтил)феназиния доказывали по увеличению (в сравнении с исходным олигонуклеотидом) времени удерживания при обращенно-фазовой хроматографии (табл. 1) и с помощью электронных спектров поглощения, в которых наблюдали максимумы поглощения, характерные как для олигонуклеотида в области 260 нм, так и для остатка красителя в области 237, 290 (плечо), 390 и 530 нм.

Для ковалентного присоединения остатков стероидов к 5'-концу олигонуклеотидов мы использовали другой подход, основанный на введении фосфорсодержащего стероидного синтона в конце синтетического цикла сборки олигонуклеотида [15, 16]. В настоящее время существует большое разнообразие различных методов синтеза стероидных производных олигонуклеотидов [6], однако использование стероид-Н-фосфонатов и сейчас

Таблица 1. Выходы и характеристики олигонуклеотидов и их производных

Шифр	Олигонуклеотид	Выход модифицированных олигонуклеотидов, %*	Время удерживания**, мин (градиент)
(Ia)	pU ^m pU ^m pC ^m pA ^m pA ^m pG ^m pG ^m pC ^m (Phn~)pU ^m pU ^m pC ^m pA ^m pA ^m pG ^m pG ^m pC ^m pG ^m pU ^m pG ^m pU ^m pG ^m pU ^m pG ^m pU ^m	75	13.5 (А) 18 (А) 17 (А)
(Iб)	(Phn~)pG ^m pU ^m pG ^m pU ^m pG ^m pU ^m pG ^m pU ^m U ^m (pU ^m) ₉	85	20.5 (А) 10.5 (Б)
(IIa)	(Chol)pU ^m (pU ^m) ₉	75	31.2 (Б)
(IIIa)	(Test)pU ^m (pU ^m) ₉ pd(T(pT)) ₉	86	14.2 (Б) 8.5 (Б)
(IIб)	(Chol)pd(T(pT)) ₉	81	25 (Б)
(IIIб)	(Test)pd(T(pT)) ₉ U(pU) ₉	89	11.5 (Б) 13.8 (Б)
(IIв)	(Chol)pU(pU) ₉	87	28 (Б)
(IIIв)	(Test)pU(pU) ₉	91	15 (Б)

* Способ расчета выхода приведен в "Эксп. части".

** Обращенно-фазовая хроматография, условия см. "Эксп. часть".

представляется нам весьма доступным, эффективным и поддающимся автоматизации способом.

Синтез стероид-Н-фосфонатов был проведен нами по аналогии с получением дезоксирибонуклеозид-Н-фосфонатов [17] в результате реакции соответствующего стероида (на примере холестерина и тестостерона) с триимидазолидом фосфора в присутствии триэтиламина с последующим гидролизом водой.

Конденсацию стероид-Н-фосфонатов со связанными с носителем защищенными олиго(2'-О-метилрибонуклеозид)-Н-фосфонатами по их 5'-гидроксилу проводили после окончания синтетического цикла и удаления концевой 5'-О-диметокситритильной группы в стандартных условиях Н-фосфонатного метода с последующим окислением и деблокированием олигонуклеотидных производных. Аналогичным образом были получены стероидные производные олигонуклеотидов дезоксириборяда и риборяда.

Таблица 2. Температуры плавления дуплексов олигонуклеотидов и их N-(2-гидроксиэтил)феназиновых производных с мишенью 3'd(GpTpApApGpTpTpCpCpGpTpG)⁵

Дуплекс	Олигонуклеотид (5' - 3')	T _{пл} , °C
A	pd(TpTpCpApApGpGpC)	35
B	pUpUpCpApApGpGpC	38
C	pU ^m pU ^m pC ^m pA ^m pA ^m pG ^m pG ^m pC ^m	38
D	(Phn~)pd(TpTpCpApApGpGpC)	45
E	(Phn~)pU ^m pU ^m pC ^m pA ^m pA ^m pG ^m pG ^m pC ^m	47

Выход в реакции присоединения стероидного остатка составлял 75–90%. Полученные стероид-олигонуклеотидные конъюгаты (II) и (III) выделяли ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией. При обращенно-фазовой хроматографии времена удерживания декануклеотидов, содержащих остаток стероида на 5'-конце, значительно возрастали по сравнению с исходными декануклеотидами (табл. 1), что свидетельствует об их повышенной гидрофобности. При этом конъюгаты олигомеров с холестерином, имеющим липофильную боковую цепь, задерживаются на колонке дольше, чем конъюгаты с тестостероном.

Как уже упоминалось, введение в структуру олигодезоксирибонуклеотидов остатков полициклических ароматических красителей способствует упрочнению образуемых ими комплементарных комплексов. В данной работе проведено изучение термической стабильности дуплексов с участием 2'-О-метилированных аналогов олигорибонуклеотидов и олигодезоксирибонуклеотидов, несущих остаток четвертичной соли N-(2-гидроксиэтил)феназина, по сравнению с дуплексами, не содержащими остаток Phn (табл. 2). В качестве мишени был использован фрагмент кДНК вируса клещевого энцефалита. Как видно из табл. 2, дуплексы В и С, в состав которых входят олигорибо- и олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды), более стабильны, чем олигодезоксирибонуклеотидный дуплекс А. Это согласуется с данными [3] о том, что замена олигорибонуклеотида в смешанных дезоксирибо-рибо-дуплексах на его 2'-О-Ме-аналог не уменьшает или даже увеличивает термическую стабильность комплекса. Сравнивая температуры плавления дуплексов А и D и С и Е, можно увидеть,

что введение остатка N-(2-гидроксиэтил)феназина в олиго(2'-О-метилрибонуклеотид) стабилизирует комплекс в той же степени, что и наличие остатка этого красителя в олигодезоксирибонуклеотиде.

Что же касается влияния остатков стероидов на комплексообразующие свойства их конъюгатов с олигонуклеотидами, то наиболее изученным объектом в этом случае является холестерин. Известно, что присоединение остатка холестерина к концевым фрагментам одной из цепей дуплекса – 5'- и 3'-фосфатам или к концевым межнуклеотидным фосфатам – слабо влияет на стабильность дуплексов, содержащих такой конъюгат [16, 18–21]. Однако до настоящего времени опубликованы данные по термической стабильности лишь олигодезоксирибонуклеотидных дуплексов, хотя в литературе имеются сведения о синтезе конъюгатов олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) с тиюхлестерином и холевой кислотой [8, 9].

Сравнительное исследование термической стабильности комплексов с участием 5'-стероидных конъюгатов олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) и их дезоксирибо- и рибо-аналогов было проведено нами на примере дуплексов, образованных гексадекарибо- и гексадекадезоксирибоаденилатами и комплементарными декануклеотидами (табл. 3). Следует отметить, что дуплексы типа (poly)dA · (poly)U обычно малоустойчивы [22], что в нашем случае проявляется в весьма низкой температуре плавления комплексов d(pA)₁₆ · (pU)₁₀ и d(pA)₁₆ · CholpU(pU)₉. Однако замена декауридилата на его 2'-О-метилованный аналог делает соответствующие дуплексы d(pA)₁₆ · U^m(pU^m)₉ и d(pA)₁₆ · CholpU^m(pU^m)₉ сравнимыми по стабильности с достаточно прочным дуплексом (pA)₁₆ · (pU)₁₀.

Введение остатка холестерина посредством фосфодизэфирной связи в 5'-положение олигонуклеотида увеличивает температуру плавления всех типов исследованных дуплексов, причем в случае производных олиго(2'-О-метилрибо)- и -рибонуклеотидов этот эффект выражен сильнее (табл. 3). Такое увеличение термической стабильности может быть связано с конформационными особенностями А-типа двойной спирали, к которому относятся дуплексы ДНК–РНК (или 2'-О-Ме-РНК) и РНК–РНК (или 2'-О-Ме-РНК). Следует отметить более выраженное стабилизирующее влияние остатков как холестерина, так и тестостерона в случае дуплексов, образованных стероидсодержащими дека(2'-О-метилуридилатами) с гексадекарибоаденилатом.

На основании полученных данных можно заключить, что описанная в данной статье модификация олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) положительно влияет на их физико-химические свой-

Таблица 3. Температуры плавления дуплексов с участием стероидсодержащих олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) и их d- и r-аналогов

Дуплекс с d(pA) ₁₆	T _{пл} , °C	Дуплекс с r(pA) ₁₆	T _{пл} , °C
(pdT) ₁₀	29	(pdT) ₁₀	29
(Chol)pd(T(pT)) ₉	32	(Chol)pd(T(pT)) ₉	31
(pU) ₁₀	<5	(pU) ₁₀	18
(Chol)pU(pU) ₉	<5	(Chol)pU(pU) ₉	24
U ^m (pU ^m) ₉	12	U ^m (pU ^m) ₉	23
(Chol)pU ^m (pU ^m) ₉	18	(Chol)pU ^m (pU ^m) ₉	31
(Test)pU ^m (pU ^m) ₉	13	(Test)pU ^m (pU ^m) ₉	27

ства, делая эти конъюгаты перспективными антисмысловыми реагентами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали рибонуклеозиды (Reanal, Венгрия), пивалоилхлорид, имидазол, N-метилимидазол, PCl₃, дихлоруксусную кислоту, тестостерон, трифенилфосфин, N-нитрозо-N-метил-4-толуолсульфамид, 4-N,N-диметиламинопиридин, 2,2-дипиридилдисульфид (Fluka, Швейцария). Остальные реактивы и растворители – препараты отечественного производства. Абсолютные растворители готовили стандартными методами. Хлорид N-(2-гидроксиэтил)феназина любезно предоставлен В.И. Сильниковым (НИБХ СО РАН). Гексадекааденилат (pA)₁₆ и декауридилат (pU)₁₀ получали согласно [23], d(pA)₁₆ и d(pT)₁₀ любезно предоставлены Е.М. Ивановой (НИБХ СО РАН). Олигодезоксирибонуклеотид дpTpTpSrArArGrGrC синтезирован В.В. Горном, олигорибонуклеотид rUpUpSrArArGrGrC получен М.Н. Репковой (НИБХ СО РАН). Синтез 5'-О-диметокситритил-N-защищенных рибонуклеозидов проводили по [24].

В качестве полимерного носителя для твердофазного синтеза использовали пористое стекло SPG-500 (120–200 меш; Fluka, Швейцария). Модификацию носителя и присоединение первого нуклеозидного звена проводили как описано в работе [25].

Анализ и идентификацию веществ осуществляли с помощью ТСХ на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах растворителей: этанол–хлороформ, 9 : 1 (А), этанол–хлороформ, 6 : 4 (Б), ацетон–вода–хлористый метилен, 30 : 0.5 : 69.5 (В). Для адсорбционной хроматографии использовали силикагель Kieselgel 60 (Merck, Германия).

Спектры ¹H-ЯМР записывали на импульсном спектрометре AM-400 (Bruker, Германия) на частоте 400 МГц, используя сигнал растворителя в качестве внутреннего стандарта. Спектры ³¹P-ЯМР регистрировали на импульсном спектрометре HX-90 (Bruker, Германия) на частоте 36.4 МГц. Отнесение

сигналов соединений проводили с использованием значений их химических сдвигов в миллионных долях относительно 85% фосфорной кислоты в качестве внешнего стандарта. ИК-спектры регистрировали с помощью спектрофотометра М-60 (Carl Zeiss, Германия).

Деблокированные олигонуклеотиды и их производные выделяли с помощью ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии на жидкостном хроматографе Waters-510 (США). Для ионообменной хроматографии использовали колонку (4.6 × 250 мм) с Полисил-СА (НПФ "Теор. практика", Россия), элюирование осуществляли в градиенте концентрации KH_2PO_4 (0–0.3 М) в 30% CH_3CN за 50 мин (скорость элюции 2 мл/мин). Обратенно-фазовую хроматографию проводили на колонке (4.6 × 250 мм) с LiChrosorb RP-18 (Merck, Германия), используя градиенты концентрации CH_3CN (0 → 30%, А, или 0 → 80%, Б) в 0.05 М LiClO_4 за 40 мин (скорость элюции 2 мл/мин).

Коэффициенты молярного поглощения немодифицированных олигонуклеотидов при 260 нм рассчитывали по данным работы [26]. Для N-(2-гидроксиэтил)феназиниевых производных олигонуклеотидов эти коэффициенты принимали равными сумме значений ϵ_{260} для немодифицированного олигонуклеотида и величины $10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для Phn-остатка [14]. Влияние стероидных остатков на значения ϵ_{260} олигонуклеотидных производных не учитывалось.

Дифференциальные кривые термической денатурации дуплексов в буфере 0.16 М NaCl, 0.02 М NaH_2PO_4 (рН 7.4), 0.1 мМ EDTA при концентрации олигонуклеотидных компонентов, равной 2.5×10^{-5} М, регистрировали на установке с терморегулируемой оптической кюветой на базе УФ-детектора жидкостного хроматографа "Милхром" (Россия) на длине волны 260 нм. Скорость нагрева образцов составляла 0.7–1°C/мин.

Общая методика метилирования. Навеску $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (375 мг, 2 ммоль) растворяли в 500 мл абс. диметилформамида и добавляли 10 ммоль предварительно высушенного 5'-О-диметокситритил-N-защищенного нуклеозида. Раствор охлаждали до 0°C и при перемешивании через реакционную смесь медленно пропускали диазометан. Газ получали из 3.3 г (15.4 ммоль) свежего N-нитрозо-N-метил-4-толуолсульфамида, что соответствует ~10 ммоль диазометана, действием конц. раствора КОН на суспензию N-нитрозо-N-метил-4-толуолсульфамида в этаноле и вытесняли слабым током гелия в колбу с реакционной смесью [27]. Перемешивание при 0°C продолжали еще 1 ч до исчезновения интенсивно-желтого окрашивания реакционной смеси. За ходом реакции следили с помощью ТСХ (система В).

После окончания реакции смесь упаривали досуха при 1–2 мм рт.ст., растворяли в 450 мл хлороформа и экстрагировали водой (3 × 150 мл). Ор-

ганические слои собирали, сушили безводным Na_2SO_4 и упаривали досуха. Затем проводили хроматографию на силикагеле (колонка 3.5 × 26 см), используя линейный градиент CH_2Cl_2 – CH_3CN (70 : 30) → CH_2Cl_2 – CH_3CN – $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (65 : 30 : 5) (общий объем 1 л) и собирая в качестве целевого продукта хроматографически более подвижный 2'-О-метил-изомер.

5'-О-Диметокситритил-2'-О-метилуридин. Выход после рехроматографии 38%. R_f 0.60 (В). ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: 8.04 (1H, д, 6-Н), 6.80–7.40 (13H, м, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Tr}$), 5.97 (1H, д, 1'-Н), 5.29 (1H, д, 5-Н), 3.50–4.40 (5H, м, 2', 3', 4', 5'-Н), 3.79 (6H, с, OCH_3 в $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Tr}$), 3.65 (3H, с, 2'- OCH_3); для 3'-О-метил-изомера: 5.90 (1H, д, 1'-Н), 3.44 (3H, с, 3'- OCH_3).

4-N-Бензоил-5'-О-диметокситритил-2'-О-метилцитидин. Выход после хроматографии 54%. R_f 0.50 (В). ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: 11.22 (1H, с, NH в NHCOC_6H_5), 8.49 (1H, д, 6-Н), 8.10–7.40 (5H, м, COC_6H_5), 6.80–7.40 (13H, м, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Tr}$), 6.01 (1H, д, 1'-Н), 5.20 (1H, д, 5-Н), 3.5–4.0 (5H, м, 2', 3', 4', 5'-Н), 3.80 (6H, с, OCH_3 в $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Tr}$), 3.71 (3H, с, 2'- OCH_3); для 3'-О-метил-изомера: 5.96 (1H, д, 1'-Н), 3.43 (3H, с, 3'- OCH_3).

6-N-Бензоил-5'-О-диметокситритил-2'-О-метиладенозин. Выход после рехроматографии 34%. R_f 0.41 (В). ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: 11.20 (1H, с, NH в NHCOC_6H_5), 8.76 (1H, с, 2-Н), 8.75 (1H, с, 8-Н), 8.10–7.40 (5H, м, C_6H_5), 6.70–7.40 (13H, м, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Tr}$), 6.19 (1H, д, 1'-Н), 3.30–4.50 (5H, м, 2', 3', 4', 5'-Н), 3.77 (6H, с, OCH_3 в $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Tr}$), 3.54 (3H, с, 2'- OCH_3); для 3'-О-метил-изомера: 6.02 (1H, д, 1'-Н), 3.47 (3H, с, 3'- OCH_3).

2-N-Изобутирил-5'-О-диметокситритил-2'-О-метилгуанозин. Выход после рехроматографии 40%. R_f 0.33 (В). ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м.д.: 8.98 (1H, с, NH в $\text{NHCOC}(\text{CH}_3)_2$), 8.29 (1H, с, 8-Н), 6.70–7.40 (13H, м, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Tr}$), 5.65 (1H, м, COCH), 5.89 (1H, д, 1'-Н), 3.50–4.40 (5H, м, 2', 3', 4', 5'-Н), 3.77 (6H, с, OCH_3 в $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{Tr}$), 3.41 (3H, с, 2'- OCH_3), 1.17–1.18 (6H, м, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); для 3'-О-метил-изомера: 5.69 (1H, д, 1'-Н), 3.44 (3H, с, 3'- OCH_3).

3'-Н-Фосфонаты N-ацил-5'-О-диметокситритил-2'-О-метилрибонуклеозидов получали в результате взаимодействия соответствующего нуклеозида с тримидазолидом фосфора согласно [17]. Выход продуктов после хроматографии на силикагеле составлял 85–90%.

Введение остатка N-(2-гидроксиэтил)феназиния в олигонуклеотиды проводили по аналогии с [14]. Высушенную цетавлоновую соль 5'-фосфата олигонуклеотида (0.5 мкмоль) растворяли вместе с 20 мкмоль трифенилфосфина, 20 мкмоль 2,2-дипиридилдисульфида и 30 мкмоль 4-N,N-диметил-аминопиридина в 30 мкл диметилсульфоксида.

Смесь выдерживали 10 мин при комнатной температуре и добавляли 30 мкл 0.2 М раствора этилендиамина в диметилформамиде. Через 10 мин нуклеотидный материал осаждали 2% раствором LiClO_4 в ацетоне, добавляли 80 мкл 0.05 М раствора (4 мкмоль) хлорида N-(2-гидроксиэтил)феназина в 0.1 М Na_2CO_3 и выдерживали 10 мин. После осаждения из реакционной смеси 2% раствором LiClO_4 в ацетоне N-(2-гидроксиэтил)феназиновое производное (I) выделяли с помощью обращенно-фазовой хроматографии.

Выходы (в расчете на исходный олигонуклеотид) и характеристики N-(2-гидроксиэтил)феназиновых производных олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) (I) приведены в табл. 1.

УФ-спектр $(\text{Phn})\text{pU}^m\text{pU}^m\text{C}^m\text{pA}^m\text{pA}^m\text{pG}^m\text{pG}^m\text{C}^m$ (0.16 М NaCl , 0.02 М NaH_2PO_4 , pH 7.4), нм: λ_{max} 237, 261, 393, 536, λ_{min} 225, 245, 432.

Синтез стероид-Н-фосфонатов. Суспензию триимидазолида фосфора в ацетонитриле, полученную по [17] из 1.2 г (17.5 ммоль) имидазола и 0.35 мл (5.25 ммоль) PCl_3 , охлаждали льдом и при перемешивании добавляли 1.5 мл (18 ммоль) триэтиламина. Через 15 мин по каплям прибавляли раствор 1.25 ммоль стероида в 60 мл абс. хлороформа и продолжали перемешивание при комнатной температуре. За ходом реакции следили с помощью ТСХ в системе А. После окончания реакции реакционную смесь разлагали водой (15 мл), упаривали досуха. Остаток растворяли в хлороформе (75 мл) и экстрагировали водой (2 × 50 мл). Органическую фазу после отделения сушили безводным Na_2SO_4 , упаривали и хроматографировали на силикагеле (150 мл), используя градиент концентрации этанола в хлороформе (0–50%), содержащем 1% триэтиламина.

Н-Фосфонат холестерина (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 85%. R_f 0.23 (Б). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1000, 1060, 1090 (C–C), 1240 (P=O), 1340 (–CH), 1460 (C–CH₃), 1600 (C=C), 2400, 2500 (P–OH), 2690 (P–H), 2860, 2950 (C–H, –CH₂–, –CH₃). ^{31}P -ЯМР (CDCl_3), δ , м. д.: 0.86 ($J_{\text{P-H}}$ 618 Гц). ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м. д.: 8.35 (1H, с, NH), 6.98 (1H, д, P–H, J 618 Гц), 5.27 (1H, м, 3–H), 3.94 (3H, м, 10–CH₃), 3.03 (6H, кв, CH₃CH₂N), 0.8–2.40 (30H, м, цикл), 1.31 (9H, т, CH₃CH₂N), 0.95 (3H, с, 18–CH₃), 0.88 (6H, с, 22-(CH₃)₂), 0.82 (3H, с, 13–CH₃).

Н-Фосфонат тестостерона (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 80%. R_f 0.29 (Б). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1000–1100 (C–C), 1220 (P=O), 1460 (C–CH₃), 1600 (C=C), 1680 (C=O), 2500 (P–OH), 2600 (P–H), 2800–3000 (C–H, –CH₂–, –CH₃). ^{31}P -ЯМР (CDCl_3), δ , м. д.: 3.43 ($J_{\text{P-H}}$ 608 Гц). ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м. д.: 8.11 (1H, с, NH), 6.68 (1H, д, P–H, J 608 Гц), 5.57 (1H, м, 17–H), 3.95 (1H, м, 4–H), 2.94 (6H, кв, CH₃CH₂N), 0.8–2.1 (17H, м, цикл), 1.21 (9H, т, CH₃CH₂N), 1.34 (3H, с, 10–CH₃), 0.68 (3H, с, 13–CH₃).

Для синтеза стероидных производных олигонуклеотидов использовали полученные твердофазным Н-фосфонатным методом на автоматическом синтезаторе “Виктория” защищенные олигонуклеотиды с межнуклеозидными Н-фосфонатными связями, присоединенные по 3'-концу к носителю и имеющие на 5'-конце свободную гидроксигруппу. Выход стероидного производного определяли в расчете на общий выход синтезированного олигонуклеотида, для чего часть полимерсвязанного олигонуклеотида обрабатывали аммиаком и выделяли хроматографически.

а) Синтез стероидных производных дека(2'-О-метилуридилата) (Chol)pU^m(pU^m)₉ и (Test)pU^m(pU^m)₉. К высушенной навеске (8 мг, удельная емкость 70 мкмоль/г по первому нуклеозидному звену, т.е. 0.5 мкмоль) полимерсвязанного U^m(pU^m)₉ добавляли 50 мкл абс. пиридина, 25 мкл абс. ацетонитрила, 25 мкл 0.1 М раствора (25 мкмоль) Н-фосфоната стероида в абс. хлороформе и 6 мкл (75 мкмоль) пивалоилхлорида. Смесь выдерживали 15 мин при комнатной температуре, носитель промывали пиридином, добавляли 100 мкл 0.2 М раствора I₂ в смеси пиридин–вода (98 : 2), выдерживали 30 мин и промывали ацетоном. Затем носитель обрабатывали 1 ч конц. NH_4OH , раствор сливали, упаривали досуха, растворяли в воде и проводили последовательно ионообменную и обращенно-фазовую ВЭЖХ. Для обращенно-фазовой хроматографии в этом случае использовали градиент Б. Выходы и характеристики производных приведены в табл. 1.

б) Синтез стероидных производных декауридилата (Chol)pU(pU)₉ и (Test)pU(pU)₉. Синтез вели аналогично описанному в “а”, при этом в процедуру выделения вводили дополнительную стадию: полученный в результате ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии стероидсодержащий олигонуклеотид с 2'-О-тетрагидропиранильными защитными группами обрабатывали 2 ч 1 мл 0.01 н. HCl при 50°C. Затем раствор нейтрализовали конц. NH_4OH , упаривали досуха, растворяли в воде и подвергали повторной обращенно-фазовой хроматографии в градиенте Б с последующим выделением олигонуклеотидного производного в виде литиевой соли. Выходы и характеристики производных декауридилата приведены в табл. 1.

в) Синтез стероидных производных декатимидилата (Chol)pd(T(pT))₉ и (Test)pd(T(pT))₉. Синтез и выделение вели аналогично описанному в пункте “а”. Выходы и характеристики производных декатимидилата приведены в табл. 1.

Работа выполнена при поддержке Государственной научно-технической программы России “Новейшие методы биоинженерии” (раздел “Геннаправленные биологически активные вещества”) и межвузовской научно-технической программы “Биотехнология” (подпрограмма “Прикладная молекулярная биотехнология”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веньяминова А.Г., Косолапова З.А., Репкова М.Н. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. С. 635–642.
2. Sproat B.S., Lamond A.I. // Antisense Research and Applications / Eds S.T. Crook, B. Lebleu. Boca Raton; Ann Arbor; London; Tokyo: CRC Press, 1993. P. 351–362.
3. Inoue H., Hayase Y., Imura A., Iwai S., Miura K., Ohtsuka E. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 6131–6148.
4. Shimizu M., Konishi A., Shimada Y., Inoue H., Ohtsuka E. // FEBS Lett. 1992. V. 302. P. 155–158.
5. Escude Ch., Sun J.-S., Rougee M., Garestier Th., Hélène C. // C. R. Acad. Sci. Paris. 1992. V. 315. P. 521–525.
6. Manoharan M. // Antisense Research and Applications / Eds S.T. Crook, B. Lebleu. Boca Raton; Ann Arbor; London; Tokyo: CRC Press, 1993. P. 303–349.
7. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. // Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton; Ann Arbor; London; Tokyo: CRC Press, 1994. P. 273–278.
8. Manoharan M., Johnson L.K., Bennett C.F., Vickers T.A., Ecker D.J., Cowser L.M., Freier S.M., Cook P.D. // Biomed. Chem. Lett. 1994. V. 4. P. 1053–1060.
9. Boutorine A.S., Venyaminova A.G., Repkova M.N., Sergeeva Z.A., Pyshnyi D.V. // Biochimie. 1994. V. 76. P. 23–32.
10. Heikkilä J., Bjorkman S., Öberg B., Chattopadhyaya J. // Acta Chem. Scand. 1982. V. 32. P. 715–717.
11. Froehler B.C., Ng P.G., Matteucci M.P. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 5399–5407.
12. Garegg P.J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R., Henrichson C. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 4051–4054.
13. Веньяминова А.Г., Левина А.С., Репкова М.Н., Ченцова Н.А. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. С. 844–846.
14. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. С. 911–920.
15. Веньяминова А.Г., Сергеева З.А., Баширова В.Г. // Биооргани. химия. 1991. Т. 17. С. 1294–1296.
16. Stein C.A., Pal P., Devico A.L., Hoke G., Mumbauer S., Kinstler O., Sarngadharan M.G., Letsinger R.L. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 2439–2444.
17. Garegg P.J., Regberg T., Stawinski J., Strömberg R. // Chem. Scr. 1986. V. 26. P. 59–62.
18. Krieg A.M., Tonkinson J., Matson S., Zhao Q., Saxon M., Zhang L.-M., Bhanja U., Yakubov L., Stein C.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 1048–1052.
19. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Часовских М.Н. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. С. 610–616.
20. Letsinger R.L., Zhang G., Sun D.K., Ikeuchi T., Sarin P.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6553–6556.
21. Letsinger R.L., Chaturvedi S.K., Farooqui F., Salunkhe M. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 7535–7536.
22. Martin F.H., Tinoco I., Jr. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. P. 2295–2299.
23. Василенко С.К., Сербо Н.А., Веньяминова А.Г., Болдырева Л.Г., Будкер В.Г., Кобец Н.Д. // Биохимия. 1976. Т. 42. С. 260–263.
24. McLaughlin L.W., Piel N., Hellmann T. // Synthesis. 1985. P. 322–328.
25. Ефимов В.А., Бурякова А.А., Ревердатто С.В., Чахмахчева О.Г. // Биооргани. химия. 1983. Т. 9. С. 1367–1381.
26. Borer P.N. // Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. V. 1 / Ed. G.D. Fasman. Cleveland: CRC Press, 1975. P. 589.
27. Lombardi P. // Chem. Ind. 1990. P. 464.

Oligo(2'-O-Methylribonucleotides) and Their Derivatives. II. Synthesis and Properties of Oligo(2'-O-Methylribonucleotides) Modified with N-(2-Hydroxyethyl)phenazinium and Steroid Groups at the 5'-Terminus

Z. A. Sergeeva, S. G. Lokhov, and A. G. Ven'yaminova

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

Abstract—Oligo(2'-O-methylribonucleotides) modified at the 5'-terminus with a steroid (cholesterol or testosterone) or polycyclic aromatic dye N-(2-hydroxyethyl)phenazinium residue were synthesized. It was shown that the introduction of an N-(2-hydroxyethyl)phenazinium moiety into octa(2'-O-methylribonucleotide) increased the melting temperature of the duplex with the *d*-target by 9°C. The steroid residue, which was attached to the 5'-position of deca(2'-O-methyluridylylate) via a phosphodiester linkage, enhanced the stability of the steroid conjugate complexes with d(pA)₁₆ and (pA)₁₆; this effect was stronger with the cholesterol derivative (ΔT_m 5 and 8°C, respectively) than with the testosterone derivative (ΔT_m 1 and 4°C).

Key words: oligo(2'-O-methylribonucleotides), oligonucleotide derivatives, chemical synthesis, thermal stability of duplexes.