



УДК 547.963.32.07

ФОТОАКТИВИРУЕМЫЕ ПЕРФТОРАРИЛАЗИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ: СИНТЕЗ И СВОЙСТВА*

© 1996 г. М. Н. Репкова, Т. М. Иванова, Р. В. Филиппов*, А. Г. Веньяминава#

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

*Новосибирский государственный университет

Поступила в редакцию 11.10.95 г. После доработки 23.01.96 г.

Описан синтез новых фотоактивируемых производных олигорибонуклеотидов, содержащих *n*-азидотетрафторбензоильную группу, присоединенную через диаминоспейсер к 5'-концевому фосфату или С-8-атому аденозина. Исследована термическая стабильность дуплексов, образуемых модифицированным олигорибонуклеотидом (RLNH)_{pr}(СрСрАрАрАрСрА) и его дезоксирибоаналогом (R = *n*-азидотетрафторбензоил-, L = –NH(CH₂)₂–) с комплементарными рибо- и дезоксирибооктануклеотидами (r и d). Показано, что стабильность дуплекса *r–r намного выше стабильности дуплекса *d–r (т. пл. 35 и 20°C), в то время как с дезоксирибомишенью модифицированный олигорибонуклеотид и его d-аналог образуют дуплексы примерно одинаковой стабильности (т. пл. 30 и 32°C соответственно).

Ключевые слова: олигорибонуклеотиды, перфторарилазидные производные, химический синтез, стабильность дуплексов.

Фотоактивируемые производные олигонуклеотидов широко используются в настоящее время для аффинного мечения биополимеров и сайт-специфической модификации нуклеиновых кислот [2–4]. Инертность фотоактивных группировок в широком диапазоне изменений химических условий в отсутствие света и высокая реакционная способность, возникающая при “включении” реагента путем облучения в нужный исследователю момент, являются неоспоримым достоинством данного типа олигонуклеотидных производных. В качестве фотоактивных групп весьма популярны ароматические азиды, обладающие высоким квантовым выходом модификации. Фотохимические превращения арилазидов представляют собой довольно сложный процесс (см. обзоры [5, 6]). Известно, что внедрение синглетного нитрена по С–Н-связям биополимера – наиболее эффективный путь образования стабильного ковалентного аддукта. Введение электронакцепторных заместителей в ароматическое кольцо азиды повышает вероятность процессов С–Н-внедрения за счет увеличения электрофильности нитренов, образующихся при фотодиссоциации азидогруппы [7]. Недавно в качестве таких обладаю-

щих повышенной способностью С–Н-внедрения фоточувствительных зондов для биологических систем было предложено использовать полифторированные арилазиды [8, 9]. Атом фтора особенно привлекателен в качестве электронакцепторного заместителя, так как благодаря своему малому размеру он не создает стерических препятствий при связывании с лигандом [10]. Было показано, что олигодезоксирибонуклеотиды, несущие *n*-азидотетрафторбензамидные группировки в различных положениях цепи, способны модифицировать ДНК [11–16], РНК [16] и белки [15, 17].

Данная работа посвящена синтезу *n*-азидотетрафторбензамидных производных олигорибонуклеотидов и изучению их свойств. Наиболее пригодной для химического синтеза арилазидоолигорибонуклеотидных конъюгатов, с нашей точки зрения, является общая стратегия, основанная на введении в олигонуклеотид на гибком спейсере алифатической аминогруппы, обладающей высокой нуклеофильностью и позволяющей осуществлять последующее присоединение фотореагентов в мягких условиях в водной среде. Недавно этот подход был использован для синтеза олигодезоксирибонуклеотидных производных, несущих арилазидные группировки на 5'-конце или по С-5-атому дезоксиуридина [11].

На схеме 1 представлен синтез олигорибонуклеотидов (Ia) и (Iб), несущих остаток *n*-азидотетрафторбензойной кислоты, присоединенный к 5'-концевому фосфату через этилендиаминовый линкер.

* Краткое сообщение см. [1].

Сокращения: r- и d- – олигонуклеотиды рибо- и дезоксирибонуклеотида, DMAP – 4-*N,N*-диметиламинопиридин, Thr – тетрагидропиридин, Py – 2-пиридил, МКХ – микроколоночная хроматография. Остальные сокращения соответствуют общепринятым.

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

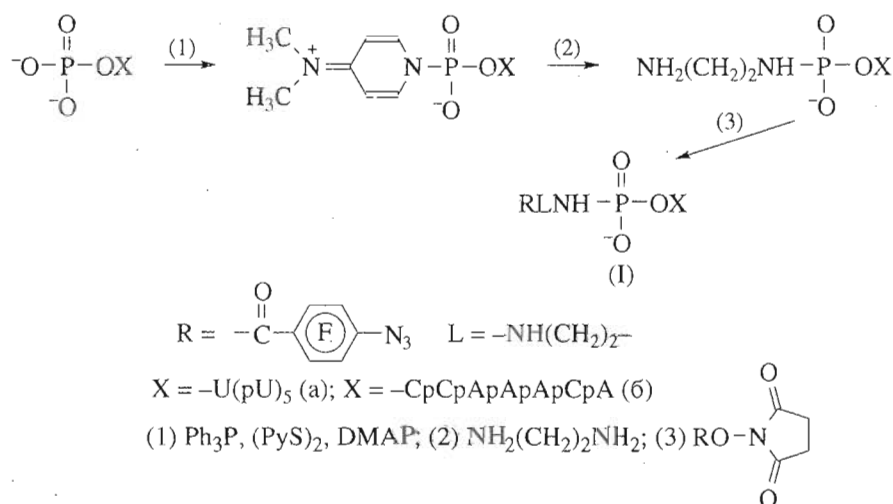
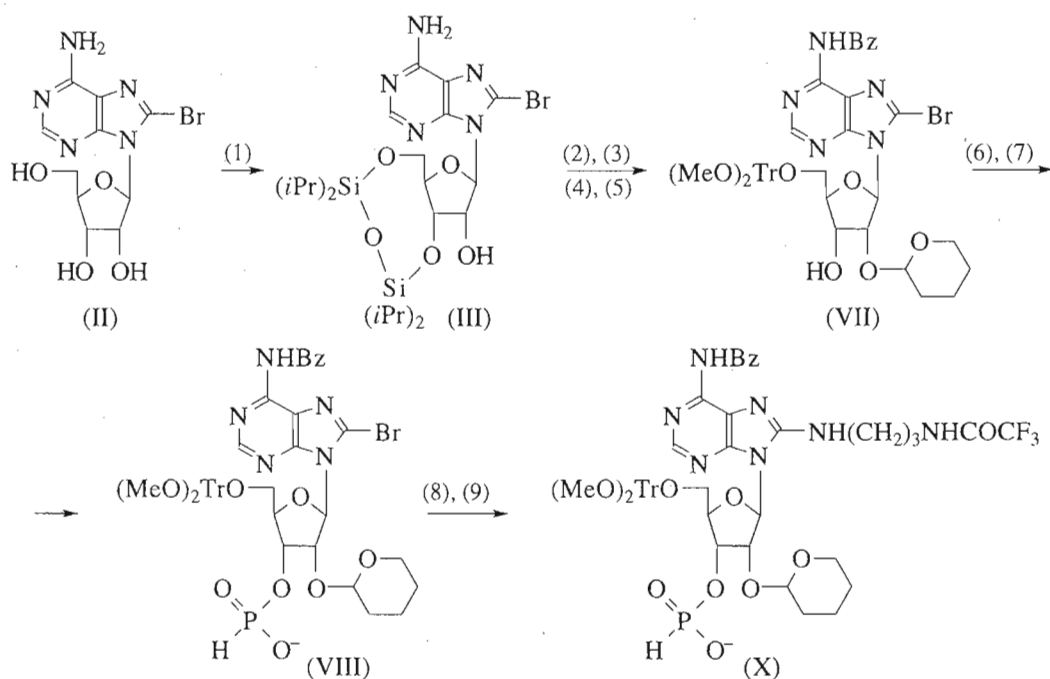


Схема 1.



(1) (iPr)₂(Cl)Si-O-Si(Cl)(iPr)₂; (2) 2,3-дигидропиран, H⁺; (3) BzCl; (4) (C₂H₅)₄NBr/KF; (5) диметокситритилхлорид; (6) салицилхлорфосфит; (7) H₂O; (8) NH₂(CH₂)₃NHCOCF₃; (9) CF₃CO₂C₂H₅

Схема 2.

Для введения алифатического амидослейсера по 5'-концу олигорибонуклеотида мы использовали подход, основанный на селективной активации 5'-фосфата незащищенного олигорибонуклеотида окислительно-восстановительной парой трифенилфосфин/дипиридилдисульфид в присутствии диметиламинопиридина как нуклеофильного катализатора с последующим взаимодействием с диаминоалканами [18]. Для селективного ацилирования алифатической аминьгруппы использовали реакцию взаимодействия с N-оксисукцинимидным эфиром *n*-азидотетрафторбензойной кисло-

ты [11], при этом степень превращения составляла ~80%.

Другой подход, основанный на использовании предварительно модифицированного мономерного синтона, был выбран для синтеза C-8-аминоаденозинсодержащих олигорибонуклеотидов. Ключевой синтон, необходимый при этом подходе, а именно 5'-O-диметокситритил-2'-O-(тетрагидропиран-2-ил)-N⁶-бензоил-8-[N-(3-трифторацетамидопропил)]аминоаденозин-3'-H-фосфонат (X), был получен из 8-бромаденозина (II) (схема 2).

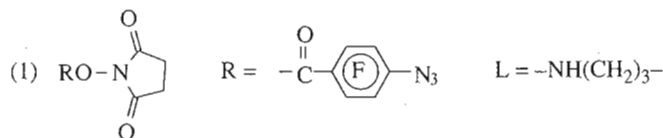
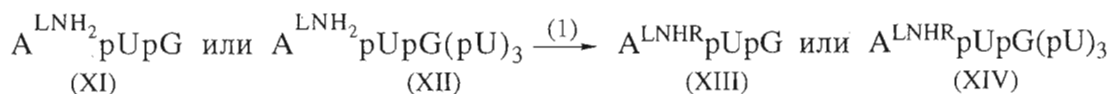


Схема 3.

Мы использовали временную защитную 3',5'-О-(тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-группировку для селективного введения 2'-О-тетрагидропиранильной группы [19]. Синтез 3'-Н-фосфоната 5',2',N-защищенного 8-бромаденозина (VIII) был выполнен по аналогии с синтезом немодифицированных рибонуклеозид-3'-Н-фосфонатов с помощью монофункционального фосфитирующего реагента салицилхлорфосфита [20]. Для введения алифатического амиолинкера в 8-е положение модифицированного аденозин-3'-Н-фосфоната (VIII) была использована реакция с 1,3-диаминопропаном при повышенной температуре [21] с последующей защитой NH₂-группы путем ее трифторацетилирования. Структура промежуточных и конечного продуктов при синтезе соединения (X) была подтверждена элементным анализом и данными УФ-, ¹H- и ³¹P-ЯМР-спектров.

Использование 3'-Н-фосфоната защищенного аденозина с трифторацетилированной С-8-алифатической аминогруппой (X) на последней стадии твердофазного Н-фосфонатного синтеза и удаление защиты с этой NH₂-группы одновременно со стандартным деблокированием олигонуклеотидов открывает путь к получению 8-алкиламиноаденозинсодержащих олигорибонуклеотидов. Эти модифицированные олигорибонуклеотиды могут

Таблица 1. Нуклеотидный состав модифицированных олигонуклеотидов (XI)–(XIV)*

Олигорибонуклеотид	Нуклеозид		
	U	G	A ^{LNH₂} или A ^{LNHR}
A ^{LNH₂} pUpG (XI)	1.0	1.1	1.0
A ^{LNH₂} pUpG(pU) ₃ (XII)	3.9	1.0	0.9
A ^{LNHR} pUpG (XIII)	1.0	1.1	1.0
A ^{LNHR} pUpG(pU) ₃ (XIV)	3.7	1.0	0.8

* По данным обращенно-фазовой МКХ гидролизатов (фосфодиэстераза и 5'-нуклеотидаза из яда кобры; условия гидролиза описаны в [22]).

служить олигомерными предшественниками в синтезе производных олигорибонуклеотидов с функциональными группировками различной химической природы, введенными в гетероциклическое основание.

В рамках данного подхода был проведен твердофазный Н-фосфонатный синтез в "ручном" варианте [22] 8-аминоаденозинсодержащих олигорибонуклеотидов A^{LNH₂}pUpG (XI) и A^{LNH₂}pUpG(pU)₃ (XII). Обработка N-оксисукуцинимидным эфиром *n*-азидотетрафторбензойной кислоты превратила эти модифицированные олигомеры в олигорибонуклеотиды (XIII) и (XIV), содержащие на 5'-конце аденозин, несущий в 8-м положении *n*-азидотетрафторбензоильную группу, присоединенную через диаминопропановый линкер (схема 3).

Нуклеотидный состав модифицированных олигорибонуклеотидов был подтвержден их гидролизом смесью фосфодиэстеразы и 5'-нуклеотидазы из яда кобры с последующим количественным анализом гидролизата методом обращенно-фазовой МКХ (табл. 1).

Выходы и характеристики синтезированных модифицированных олигорибонуклеотидов приведены в табл. 2.

Арилизидсодержащие олигонуклеотиды являются весьма удобными реагентами для изучения окружения молекул биополимеров, так как для фотоактивируемого ковалентного присоединения не нужны специальные функциональные группы у соседних молекул. Синтезированные в данной работе новые аналоги мРНК предполагается использовать для фотоаффинного мечения рибосом из плаценты человека.

Взаимодействие реакционноспособных производных олигонуклеотидов с нуклеиновыми кислотами зависит от их способности образовывать комплементарные комплексы. Ранее [23] было показано, что введение *n*-азидотетрафторбензоильной группы в олигодезоксирибонуклеотид через алифатический амиолинкер либо по концевому фосфату, либо по 5-положению дезоксиуридина не только не дестабилизирует дуплексы, но даже несколько увеличивает их температуру плавления. В данной работе изучена термическая

Таблица 2. Выходы и характеристики синтезированных олигорибонуклеотидов

Олигорибонуклеотид	Выход ^{2*} , %	Время удерживания, мин	Обращенно-фазовая МКХ*			
			Спектральные соотношения			
			$\frac{250}{260}$	$\frac{270}{260}$	$\frac{280}{260}$	$\frac{290}{260}$
(pU) ₆	5 (61)	7.0	0.77	0.84	0.40	0.06
(RLNH)pU(pU) ₅ (Ia)	38 ^{3*}	10.4	0.79	0.82	0.40	0.09
pCpCpApApApCpA	5 (65)	7.4	0.83	0.83	0.48	0.16
(RLNH)pCpCpApApApCpA (Iб)	30 ^{3*}	10.9	0.83	0.83	0.88	0.15
ApUpG	42 (65)	6.2	0.89	0.76	0.39	0.14
A ^{LNH₂} pUpG (XI)	23 (48)	7.8	0.82	0.99	0.84	0.48
ApUpG(pU) ₃	8 (60)	8.4	0.84	0.80	0.40	0.11
A ^{LNH₂} pUpG(pU) ₃ (XII)	7 (59)	9.8	0.79	0.93	0.65	0.30
A ^{LNHR} pUpG (XIII)	67 ^{4*}	11.8	0.82	0.91	0.72	0.40
A ^{LNHR} pUpG(pU) ₃ (XIV)	67 ^{4*}	12.6	0.81	0.90	0.62	0.30

* Условия приведены в "Экспериментальной части".

^{2*} Приведен общий выход (выход на стадию) в олигонуклеотидном синтезе.

^{3*} В расчете на исходный 5'-фосфорилированный олигорибонуклеотид.

^{4*} В расчете на исходный NH₂-содержащий олигорибонуклеотид.

Таблица 3. Температура плавления дуплексов (A)–(D) (°C)*

Мишень	Модифицированный олигонуклеотид	
	(RLNH)pr(CpCpApApApCpA)	(RLNH)pd(CpCpApApApCpA)
r(UpGpUpUpUpGpGpC)	35 (A)	20 (B)
pd(TpGpTpTpTpGpGpC)	30 (C)	32 (D)

* Условия приведены в "Экспериментальной части".

стабильность дуплексов 5'-P-модифицированного гептарибонуклеотида (Iб) и его d-аналога с r- и d-октануклеотидами одинакового строения (табл. 3). Модифицированный гептадезоксирибонуклеотид образует с d-мишенью дуплекс D с т. пл. 32°C, что подтверждает позитивное влияние 5'-P-перфторариллазидной группы на стабильность дуплексов (температура плавления аналогичного немодифицированного дуплекса в этих же условиях составляет 28°C [24]). В случае рибомишени стабильность дуплекса A существенно выше стабильности дуплекса B, в то же время с дезоксирибомишенью как модифицированный олигорибонуклеотид (Iб), так и его дезоксирибоаналог

образуют дуплексы примерно одинаковой стабильности (дуплексы C и D).

Полученные данные говорят о том, что синтезированные новые фотоактивные производные олигорибонуклеотидов могут быть использованы как реагенты для сайт-специфической фото-модификации нуклеиновых кислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали рибонуклеозиды (Reanal, Венгрия), пивалоилхлорид, дихлоруксусную кислоту, 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопротил-

1,3-дисулfoxан, диэтилпирокарбонат, 2,2-дипиридилдисульфид, диметиламинопирин, трифенилфосфин, цетилтриметиламмонийбромид (Fluka, Швейцария); остальные реактивы и растворители отечественного производства. Безводные растворители готовили стандартными методами. N-Оксисукцинимидный эфир *n*-азидотетрафторбензойной кислоты синтезирован Т.А. Приходько по [25]. N-Ацил-5'-О-диметокситритил-2'-О-(тетрагидропиран-2-ил)-рибонуклеозиды получали по [19]. Синтез N-ацил-5'-О-диметокситритил-2'-О-(тетрагидропиран-2-ил)-рибонуклеозид-3'-Н-фосфонатов проводили по методу, описанному нами ранее [20].

В качестве полимерного носителя для твердофазного синтеза использовали стекло CPG-500 (120–200 меш, Fluka, Швейцария). Модификацию полимера и присоединение первого нуклеозидного звена проводили как описано в работе [26]. Количество введенного нуклеозидов составляло ~30 мкмоль/г.

Олигорибонуклеотиды синтезировали твердофазным N-фосфонатным методом в "ручном" варианте [22]. 5'-Фосфорилированные олигорибонуклеотиды получали с использованием β-цианэтилфосфита [27].

Олигодезоксирибонуклеотид-5'-фосфаты были синтезированы О.С. Перебоевой модифицированным триэфирным методом в растворе. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих *n*-азидотетрафторбензамидную группировку по 5'-концевому фосфату, проводили по [11]. Выходы продуктов в реакции ацилирования 55–71%. Гомогенность, по данным микроколоночной хроматографии, 96%.

Анализ и идентификацию веществ проводили с помощью ТСХ на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системах растворителей: метанол–хлороформ, 3 : 7 (А); этанол–хлороформ, 0.5 : 9.5 (Б); этанол–хлороформ, 0.1 : 9.9 (В); этанол–хлороформ–триэтиламин, 4 : 5.9 : 0.1 (Г); этанол–конц. NH₄OH, 4 : 1 (Д).

УФ-спектры соединений регистрировали для растворов в этаноле (где не указано особо) на спектрофотометре Specord UV-VIS (Германия). Спектры ³¹P- и ¹H-ЯМР (81.015 и 200.132 МГц соответственно) получены на спектрометре WP-200 (Bruker, ФРГ). Химические сдвиги в ³¹P-ЯМР-спектрах приведены относительно сигнала ортофосфорной кислоты (внешний стандарт). В качестве внутреннего стандарта в ¹H-ЯМР-спектрах использовали CDCl₃ (δ 7.24 м. д.).

Препаративную ВЭЖХ олигонуклеотидов проводили на хроматографе Waters (США), используя для ионообменной хроматографии колонку (4.6 × 250 мм) с Полисил-СА [28]; элюирование в градиенте концентрации KH₂PO₄ (0–0.3 М, pH 6.5) в 30% ацетонитриле; скорость 2 мл/мин. Для обра-

щенно-фазовой хроматографии использовали колонку (4.6 × 250 мм) с LiChrosorb RP-18 (Merck, ФРГ) и градиент концентрации ацетонитрила (0–20%) в 0.05 М растворе LiClO₄; скорость элюции 2 мл/мин. Олигонуклеотиды выделяли в виде литиевых солей осаждением из водного раствора в 2% раствор LiClO₄ в ацетоне. Обратнo-фазовую микроколоночную хроматографию проводили на хроматографе "Милихром" (Россия), используя колонку (2 × 62 мм) с Nucleosil C-18 (5 мкм, Macherey-Nagel, Германия) и градиент концентрации метанола (0–80%) в 0.02 М трис-ацетате, pH 5.0, со скоростью потока 100 мкл/мин. Хроматографические данные в режиме детекции на шести длинах волн со спектрофотометрического детектора хроматографа "Милихром" были получены и обработаны с помощью IBM PC-486.

Стерилизацию воды и используемых водных растворов при работе с деблокированными олигорибонуклеотидами проводили, добавляя диэтилпирокарбонат (до 0.02%) и выдерживая данный раствор 12 ч при 37°C либо 2 сут при комнатной температуре.

Для ферментативного гидролиза олигонуклеотидов использовали смесь фосфодиэстеразы (КФ 3.1.4.1) и 5'-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5) из яда кобры (*Naja naja oxiana*), любезно предоставленную В.И. Ямковым (Новосибирский госуниверситет).

Коэффициенты молярного поглощения немодифицированных олигонуклеотидов при 260 нм рассчитывали по данным работы [29]. Для модифицированных по 5'-фосфату олигонуклеотидов эти коэффициенты принимали равными сумме значений ε₂₆₀ для немодифицированного олигонуклеотида и величины 23300 М⁻¹ см⁻¹ для N₃C₆F₄CONH(CH₂)₃OH [23]. Коэффициент молярного поглощения 8-[N-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоил)-3-аминопропил]аминоаденозина считали равным сумме значений ε₂₆₀ для 8-[N-(3-аминопропил)]аминоаденозина и величины 23200 М⁻¹ см⁻¹ для N₃C₆F₄CO-группы [30].

Дифференциальные кривые термической денатурации комплементарных дуплексов с концентрацией олигонуклеотидов 2.5 × 10⁻⁵ М в буфере 0.16 М NaCl, 0.02 М Na₂HPO₄, 0.1 мМ EDTA (pH 7.4) регистрировали на установке для исследования термической денатурации в ультрамикромасштабе, созданной в НИИХ СО РАН на базе микроспектрофотометра "Обь-4".

8-Бромаденозин (II) получали по методу [31] с выходом 70%. Найдено, %: С 34.51; Н 3.53; N 20.0; Br 23.18. C₁₀H₁₂N₅O₄Br. Вычислено, %: С 34.7; Н 3.49; N 20, 23; Br 23.08. УФ-спектр, нм (ε, М⁻¹ см⁻¹): λ_{max} 215 (18400), 265 (14800); λ_{min} 230 (3000). Спектральные соотношения (МКХ): 250/260 0.78; 270/260 0.71; 280/260 0.19; 290/260 0.01.

8-[N-(3-Аминопропил)]аминоаденозин [21]. К раствору 0.4 г (1.15 ммоль) 8-бромаденозина в 10 мл абс. пиридина добавляли 2 мл (1.78 г, 24 ммоль) 1,3-диаминопропана. Раствор выдерживали 10 ч при 85°C (контроль – ТСХ, система Д). Пиридин упаривали, остаток промывали эфиром, сушили, растворяли в метаноле и хроматографировали на силикагеле с элюцией смесью метанол–конц. NH₄OH–вода (6 : 2 : 2). Фракции, соответствующие основному продукту (*R_f* 0.2 (Д)), упаривали досуха. Выход 8-[N-(3-аминопропил)]аминоаденозина 0.2 г (51%). Для аналитических целей проводили обращенно-фазовую хроматографию на LiChroprep RP-18, используя градиент концентрации ацетонитрила (0–50%) в 0.05 М ТЕАВ. УФ-спектр (нм), D₂O (ε, М⁻¹ см⁻¹): λ_{max} 278 (16600); 260 (9300); λ_{min} 237 (1950). ¹H-ЯМР (D₂O), δ, м. д.: 7.71 (1H, с, H2), 5.74 и 5.72 (1H, д, J 5 Гц, H1'), 4.51 (1H, м, H2' или H3'), 4.19 (1H, м, H3' или H2'), 4.06 (1H, м, H4'), 3.70 (2H, м, H5'), 3.22, 2.79, 1.75 (метиленовые протоны фрагмента -NHCH₂CH₂CH₂NH₂).

3',5'-О-(Тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-8-бромаденозин (III) (по аналогии с [19]). 8-Бромаденозин (II) (4.6 г, 13 ммоль) упаривали с абс. пиридином и добавляли 46 мл абс. пиридина и 4.6 мл (15 ммоль) 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропил-1,3-дисилоксана. Через 1 ч (контроль – ТСХ, система А) реакционную смесь упаривали до малого объема (около 5 мл) и экстрагировали хлороформом. После хроматографии на силикагеле выход продукта (III) составлял 2 г (95%). *R_f* 0.28 (Б). Гомогенность, по данным обращенно-фазовой МКХ, 97%. Спектральные соотношения (МКХ): 250/260 0.68; 270/260 0.98; 280/260 0.55; 290/260 0.16. УФ-спектр, нм (ε, М⁻¹ см⁻¹): λ_{max} 215 (22000), 265 (16000); λ_{min} 230 (3400).

2'-О-(Тетрагидропиран-2-ил)-N⁶-бензоил-8-бромаденозин (VI) (по аналогии с [19]). К раствору 5.8 г (9.8 ммоль) нуклеозида (III) в 6% мл сухого хлороформа добавляли 2.4 г (13.7 ммоль) моногидрата *n*-толуолсульфокислоты, 5.4 мл (4.8 г, 56.7 ммоль) свежеперегнанного 2,3-дигидропирана и выдерживали реакционную смесь 1 ч при комнатной температуре (ТСХ, система Б). К реакционной смеси добавляли 2.5 мл триэтиламина и 50 мл насыщенного раствора NaHCO₃, органический слой отделяли, водный слой экстрагировали хлороформом. Темный маслообразный остаток после упаривания очищали хроматографией на силикагеле, используя для элюции линейный градиент концентрации этанола в хлороформе (0–5%). Выход 2'-О-(тетрагидропиран-2-ил)-3',5'-О-(тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-8-бромаденозина (IV) 4.2 г (64%). *R_f* 0.39 (Б).

Защищенный нуклеозид (IV) (4.2 г, 6.3 ммоль) сушили упариванием с абс. пиридином, растворяли в 20 мл абс. пиридина и при охлаждении льдом

и перемешивании добавляли по каплям 1.6 мл (2.0 г, 14.1 ммоль) хлористого бензоила. Перемешивание продолжали еще 2.5 ч при комнатной температуре до завершения реакции и образования смеси моно- и бис-N-бензоильных производных соединения (IV) (контроль – ТСХ, система В). Затем к реакционной смеси добавляли 50 мл насыщенного раствора NaHCO₃ и проводили экстракцию хлороформом (3 × 10 мл).

Остаток после упаривания сушили упариванием с абс. пиридином (3 × 5 мл), растворяли в 15 мл абс. пиридина, добавляли 0.45 мл (0.45 г, 5.2 ммоль) абс. морфолина и выдерживали 50 мин при комнатной температуре для превращения бис-N-бензоильного производного в монозамещенное (ТСХ, система В). Реакционную смесь упаривали и продукт (V) выделяли хроматографией на силикагеле, используя линейный градиент концентрации этанола (0–2%) в смеси хлороформ–пентан (1 : 1). Фракции, содержащие 2'-О-(тетрагидропиран-2-ил)-3',5'-О-(тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-N⁶-бензоил-8-бромаденозин (V) (*R_f* 0.40 (В)), упаривали до маслообразного остатка.

Для удаления тетраизопропилдисилоксановой защитной группы соединение (V) растворяли в 60 мл ацетонитрила, добавляли 6.2 г (29.6 ммоль) тетраэтиламмонийбромида и 6.3 мл 5 н. водного раствора KF и перемешивали реакционную смесь 1 ч при 60°C (контроль – ТСХ, система В). Реакционную смесь упаривали досуха и добавляли равные объемы (около 20 мл) воды и хлороформа. После стандартной обработки вещество трижды хроматографировали на силикагеле, используя для элюции линейный градиент концентрации этанола (0–5%) в хлороформе. Выход 2'-О-(тетрагидропиран-2-ил)-N⁶-бензоил-8-бромаденозина (VI) (в виде смеси двух диастереомеров) составлял 1.2 г (24% в расчете на исходный (III)). *R_f* 0.24 и 0.27 (В). Гомогенность, по данным обращенно-фазовой МКХ, 91%. Спектральные соотношения (МКХ): 250/260 1.47; 270/260 0.71; 280/260 0.76; 290/260 1.12. УФ-спектр, нм (ε, М⁻¹ см⁻¹): λ_{max} 240 (18800), 300 (14000); λ_{min} 220 (12800), 270 (7000). ¹H-ЯМР (CDCl₃), δ, м. д.: 8.95 (1H, с, -NHCO-), 8.61 (1H, с, H2), 7.98 (2H, м, -COC₆H₅), 7.53 (3H, м, -COC₆H₅), 6.00 (1H, д, J 5 Гц, H1' более и менее хроматографически подвижных диастереомеров), 5.38 (1H, м, H2' или H3'), 4.53 (1H, м, H3' или H2'), 4.43 (1H, м, H4'), 4.28 (1H, с, ацетальный протон Thr), 3.85 (4H, м, -OCH₂- в Thr-группе и H5'), 1.6 (6H, м, -CH₂- в Thr-группе).

5'-О-Диметокситритил-2'-О-(тетрагидропиран-2-ил)-N⁶-бензоил-8-бромаденозин (VII) синтезировали в стандартных условиях [19] из 1 г (1.9 ммоль) 2'-О-(тетрагидропиран-2-ил)-N⁶-бензоил-8-бромаденозина (VI) и 0.7 г (2.1 ммоль) (MeO)₂TtCl. После хроматографии на силикагеле выход соединения

(VII) (в виде смеси двух диастереомеров) составлял 1.4 г (93%). R_f 0.52 и 0.54 (ТСХ, система Б). УФ-спектр (нм): λ_{\max} 235,285; λ_{\min} 222, 265. ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м. д.: 8.98 (1H, с, $-\text{NHCO}-$), 8.54 (1H, с, H2), 7.98–6.73 (13H, м, $(\text{MeO})_2\text{Tr}$; 5H, м, $-\text{COC}_6\text{H}_5$), 6.20 (1H, д, J 5 Гц, H1' более и менее хроматографически подвижных диастереомеров), 5.46 (1H, м, H2' или H3'), 4.75 (1H, м, H3' или H2'), 4.20 (1H, м, H4'), 3.74 (6H, с, $-\text{OCH}_3$), 4.54 (1H, с, ацетальный протон Thr), 3.61–2.75 (4H, м, $-\text{OCH}_2-$ в Thr-группе и H5'), 1.44 (6H, уш, $-\text{CH}_2-$ в Thr-группе).

5'-О-Диметокситритил-2'-О-(тетрагидропиран-2-ил)-N⁶-бензоил-8-бромаденозин-3'-Н-фосфонат (VIII) (по аналогии с [20]). К охлажденному льдом раствору защищенного нуклеозида (VII) (0.5 г, 0.6 ммоль) в смеси 3 мл абс. диоксана и 0.3 мл (2.7 ммоль) абс. N-метилморфолина добавляли 0.5 мл 1.25 М раствора салицилхлорфосфита в диоксане. Через 5–10 мин (ТСХ, система Б) к реакционной смеси добавляли 1 мл 1 М ТЕАВ (рН 8.5) и экстрагировали хлороформом (3 × 5 мл). Объединенные органические слои промывали последовательно насыщенным водным раствором NaHCO_3 (5 мл) и 1 М ТЕАВ (рН 8.5; 5 мл), высушивали безводным Na_2SO_4 и упаривали с абс. ацетонитрилом (3 × 5 мл). Продукт выделяли хроматографией на силикагеле, используя для элюции линейный градиент концентрации этанола (0–30%) в хлороформе, содержащем 1% ТЕА. Выход соединения (VIII) 0.5 г (83%). R_f 0.30 (Г), 0.85 (Д). Спектральные соотношения (МКХ): 250/260 1.35; 270/260 1.11; 280/260 1.60; 290/260 1.58. ^{31}P -ЯМР ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}-\text{CH}_3\text{CN}$, 1 : 1), δ , м. д.: 2.02; 2.16 ($J_{\text{P-H}}$ 610 Гц).

5'-О-Диметокситритил-2'-О-(тетрагидропиран-2-ил)-N⁶-бензоил-8-[N-(3-трифторацетиламинопропил)]аминоаденозин-3'-Н-фосфонат (X) (по аналогии с [21]). Соединение (VIII) (0.5 г, 0.5 ммоль) растворяли в 3 мл абс. пиридина, добавляли 0.7 мл свежеперегнанного 1,3-диаминопропана и выдерживали 1 сут при 80°C (анализ ТСХ, система Д). Упаривали смесь до масла, упаривали с этанолом (3 × 5 мл) и хроматографировали на силикагеле, используя для элюции смесь этанол–вода (1 : 1), рН которой доводили до 8 разбавленным раствором NH_4OH . Выход 5'-О-диметокситритил-2'-О-(тетрагидропиран-2-ил)-N⁶-бензоил-8-[N-(3-аминопропил)]аминоаденозин-3'-Н-фосфоната (IX) 0.3 г (60%). R_f 0.75 (Д). Спектральные соотношения (МКХ): 250/260 0.78; 270/260 1.41; 280/260 1.37; 290/260 0.60.

Соединение (IX) (0.3 г, 0.3 ммоль) упаривали с абс. метанолом (3 × 1 мл), растворяли в 3 мл абс. метанола, добавляли 0.75 мл (6 ммоль) этилового эфира трифторуксусной кислоты и 0.05 мл (0.35 ммоль) триэтиламина и выдерживали 45 мин при комнатной температуре (контроль – ТСХ, система Г). Остаток после упаривания хроматогра-

фировали на силикагеле, используя линейный градиент концентрации этанола в хлороформе (0–40%). Выход соединения (X) 0.23 г (70%). R_f 0.30 (Г) и 0.85 (Д). Гомогенность, по данным обращенно-фазовой МКХ, 91%. Спектральные соотношения: 250/260 0.78; 270/260 1.40; 280/260 1.45; 290/260 0.78. УФ-спектр, нм (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): λ_{\max} 278 (19600); λ_{\min} 255 (10000). ^1H -ЯМР (CDCl_3), δ , м. д.: 12.19 (1H, уш, $-\text{NHCOCF}_3$), 9.34 (1H, м, $-\text{NH}-$ в $-\text{NHCOC}_6\text{H}_5$), 8.11 (1H, с, H2), 8.48 и 5.33 (1H, д, $J_{\text{P-H}}$ 610 Гц), 7.30–6.76 (13H, м, $(\text{MeO})_2\text{Tr}$ – и 5H, м, $-\text{COC}_6\text{H}_5$), 6.32 (1H, д, J 5 Гц, H1'), 5.76 (1H, уш, $-\text{NH}-$ в $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -группировке), 4.93 (3H, м, H2', H3' и H4'), 4.41 (1H, с, ацетальный протон Thr), 3.74 (6H, с, $-\text{OCH}_3$), 3.44 (4H, м, $-\text{OCH}_2-$ в Thr-группе и H5'), 3.04 (6H, кв, $-\text{CH}_2-$ в TEAH^+), 1.58–1.3 (6H, м, $-\text{CH}_2-$ в Thr-группе и 9H, т, $-\text{CH}_3$ в TEAH^+).

Синтез модифицированных олигорибонуклеотидов. а) Присоединение этилендиаминового спейсера к 5'-фосфату олигорибонуклеотидов проводили по аналогии с [18]. Олигонуклеотид $(\text{pU})_6$ или pCrCrArArArCrA (5 OE_{260}) в виде цетавлоновой соли тщательно высушивали, растворяли в смеси 30 мкл абс. диметилформамида и 30 мкл абс. диметилсульфоксида, добавляли 6.8 мг (25 мкмоль) трифенилфосфина, 5.3 мг (25 мкмоль) дипиридилдисульфида и 5 мг (40 мкмоль) диметиламинопиридина. Через 15–20 мин к смеси добавляли 1 мкл (15 мкмоль) этилендиамина и перемешивали реакционную смесь в течение 1 ч. Нуклеотидный материал осаждали 2% LiClO_4 в ацетоне и 3 раза переосаждали из 3 М LiClO_4 . Осадок промывали ацетоном и высушивали. Степень превращения в данной реакции составляла 80–90% (анализ методом ионообменной ВЭЖХ).

б) Тририбонуклеозиддифосфат $\text{A}^{\text{LNH}_2}\text{pUpG}$ (XI) и гексарибонуклеозидпентафосфат $\text{A}^{\text{LNH}_2}\text{pUpG}(\text{pU})_3$ (XII) синтезировали твердофазным Н-фосфонатным методом [22] в “ручном” варианте в масштабе 1.5 мкмоль, используя наряду с немодифицированными Н-фосфонатными мономерами 5'-О-диметокситритил-2'-О-(тетрагидропиран-2-ил)-N⁶-бензоил-8-[N-(3-трифторацетиламинопропил)]аминоаденозин-3'-Н-фосфонат (X). Конденсацию в каждом цикле наращивания олигонуклеотидной цепи проводили, добавляя равные объемы (3 × 0.135 мл) 0.025 М раствора нуклеозид-Н-фосфоната и 0.125 М раствора пивалоилхлорида в смеси пиридин–ацетонитрил (1 : 1). Время конденсации 3 мин. После проведения необходимого числа циклов осуществляли окисление синтезированного олигомера, снятие с полимера и гидролиз всех защитных групп в стандартных условиях [22].

в) Синтез *n*-азидотетрафторбензамидных производных олигорибонуклеотидов (Ia, Ib, XIII, XIV) вели по аналогии с [11]. К раствору 2–5 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида, содержащего алифатическую NH₂-группу по 5'-фосфату или 8-му положению аденозина, в 20 мкл смеси вода–диметилформамид (1 : 1) через каждые 30 мин добавляли порциями по 10, 5 и 5 мкл раствор *N*-оксисукцинимидного эфира *n*-азидотетрафторбензойной кислоты (1.8 мг, 6 мкмоль) в 20 мкл диметилформамида. Через 30 мин после последнего добавления реагента реакцию смесь осаждали 2% раствором LiClO₄ в ацетоне, центрифугировали, промывали ацетоном и продукт выделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ. Степень превращения в реакции ацилирования, по данным обращенно-фазовой ВЭЖХ, 70–80%. Гомогенность выделенных модифицированных олигонуклеотидов, по данным МКХ, 92–97%.

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").

Авторы благодарят О.Л. Березняк за синтез олигорибонуклеотидов, Н.И. Комарову за анализ олигонуклеотидов и их производных, С.Г. Лохова за определение температуры плавления дуплексов, М.А. Иванову за помощь в оформлении статьи и М.И. Добрикова за полезную дискуссию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Veniaminova A.G., Repkova M.N., Ivanova T.M., Dobrikov M.I., Karpova G.G., Zarytova V.F. // Nucl. Acids Symp. Ser. 1994. P. 207–208.
- 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.
- Hanna M.N. // Methods Enzymol. 1989. V. 180. P. 383–409.
- Sylvers L.A., Wower J. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 411–419.
- Bayley H., Staros J.V. // Azides and Nitrenes: Reactivity and Utility / Ed. E.F.V. Scriven. Orlando, FL: Acad. Press, 1984. P. 433–490.
- Bayley H. // Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology / Eds T.S. Work, R.H. Burdon. N. Y.: Elsevier, 1983. P. 1–187.
- Reiser A., Leyshon L.J. // J. Am. Chem. Soc. 1970. V. 92. P. 7487–7491.
- Leyva E., Young M.J.T., Platz M.S. // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 8307–8309.
- Keana J.F.W., Cai S.X. // J. Fluorine Chem. 1989. V. 43. P. 151–154.
- Soundararajan N., Shwu Huey Liu, Soundararajan S., Platz M.S. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 256–261.
- Добриков М.И., Зарытова В.Ф., Комарова Н.И., Левина А.С., Лохов С.Г., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 540–549.
- Добриков М.И., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 1190–1196.
- Левина А.С., Табатадзе Д.Р., Зарытова В.Ф., Добриков М.И., Горн В.В., Халимская Л.М. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 21–29.
- Левина А.С., Табатадзе Д.Р., Зарытова В.Ф., Добриков М.И., Горн В.В., Лохов С.Г. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 30–39.
- Doronin S.V., Dobrikov M.I., Buckle M., Roux P., Vuc H., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1994. V. 354. P. 200–202.
- Levina A.S., Berezovskii M.V., Venyaminova A.G., Dobrikov M.I., Repkova M.N., Zarytova V.F. // Biochimie. 1993. V. 75. P. 25–27.
- Mitina R.L., Doronin S.V., Dobrikov M.I., Tabatadze D.R., Levina A.S., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1992. V. 312. P. 249–251.
- Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Мальцева Т.В., Халимская Л.М. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 1246–1252.
- Markiewicz W.T., Biala E., Kierzek R. // Bull. Pol. Acad. Sci.: Chem. 1984. V. 32. P. 433–451.
- Веньяминова А.Г., Комарова Н.И., Левина А.С., Репкова М.Н. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 484–489.
- Sarfati S.R., Pochet S., Guerreiro C., Namane A., Huynh-Dinh T., Igolen J. // Tetrahedron. 1987. V. 43. P. 3491–3497.
- Веньяминова А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 941–950.
- Levina A.S., Tabatadze D.R., Khalimskaya L.M., Pritchodko T.A., Shishkin G.V., Alexandrova L.A., Zarytova V.F. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 319–325.
- Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Лохов С.Г., Мальцева Т.В., Сергеев Д.С. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 1369–1378.
- Добриков М.И., Приходько Т.А., Сафронов И.В., Шишкин Г.В. // Сиб. хим. журн. 1992. Вып. 2. С. 18–24.
- Ефимов В.А., Бурякова А.А., Ревердатто С.В., Чахмахчева О.Г. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 1367–1381.
- Веньяминова А.Г., Левина А.С., Репкова М.Н., Ченцова Н.А. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 844–846.

28. Ястребов С.И. Способ получения сорбента: А. с. СССР 1153976 // Б. И. 1985. № 17. С. 28.
29. Borer P.N. // Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. V. 1 / Ed. G.D. Fasman. Cleveland: CRC Press, 1975. P. 589.
30. Wlassoff W.A., Dobrikov M.I., Safronov I.V., Dudko R.Y., Bogachev V.S., Kandaurova V.V., Shishkin G.V., Dymshits G.M., Lavrik O.I. // Bioconjugate Chem. 1995. V. 6. P. 352–360.
31. Ikehara M., Kaneko M. // Tetrahedron. 1970. V. 26. P. 4251–4259.

Photoactive Perfluoroarylazido Derivatives of Oligoribonucleotides: Synthesis and Properties¹

M. N. Repkova*, T. M. Ivanova*, R. V. Filippov**, and A. G. Ven'yaminova*²

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

** Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

Abstract—The synthesis of novel photoreactive oligoribonucleotide derivatives containing a *p*-azidotetrafluorobenzoyl group attached through a diamino spacer to the 5'-terminal phosphate or adenosine C-8 atom is described. The thermal stability of the duplexes formed by the modified (RLNH)_n(CpCpApApCpA) oligoribonucleotide and its deoxyribo analogue (R = *p*-azidotetrafluorobenzoyl, L = –NH(CH₂)₂–) with the complementary ribo- and deoxyribooctanucleotides (r and d) was studied. It is found that the stability of the *r–r duplex is much higher than that of the *d–r duplex (*T*_m 35 and 20°C), whereas with the deoxyribo target the modified oligoribonucleotide and its d-analogue form duplexes of approximately equal stability (*T*_m 30 and 32°C, respectively).

Key words: oligoribonucleotides, perfluoroarylazido derivatives, chemical synthesis, duplex stability.

¹ For the short communication see [1].

² To whom correspondence should be addressed; phone: 7-383-2-39-6275; fax: 7-383-2-35-1665; e-mail: ven@modul.bioch.nsk.su.