



УДК 547.963.32:577.113.4

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ 9-(2'-АМИНО-2'-ДЕЗОКСИ-β-D-АРАБИНОФУРАНОЗИЛ)АДЕНИН

© 1997 г. Е. М. Зубин, С. И. Анцыпович, Т. С. Орецкая*,
Е. А. Романова, Е. М. Волков, В. Н. Ташлицкий, З. А. Шабарова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет
119899, Москва, В-234, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 25.12.96 г. Принята к печати 11.03.97 г.

Разработан способ синтеза модифицированного производного 2'-амино-2'-дезоксидеокси-арабино-аденозина для его направленного введения в олигонуклеотидную цепь в процессе твердофазного химического синтеза. Получены олигонуклеотиды длиной от 6 до 25 нуклеотидных звеньев с включениями 2'-амино-2'-дезоксидеокси-арабино-аденозина. Продемонстрирована высокая реакционная способность 2'-аминогруппы при ацилировании ангидридами карбоновых кислот. Показано, что включение модифицированных звеньев в олигонуклеотиды не препятствует образованию ДНК-дуплекса.

Ключевые слова: модифицированные олигонуклеотиды, 9-(2'-амино-2'-дезоксидеокси-β-D-арабинофуранозил)аденин.

В настоящее время развитие эффективных методов химического синтеза олигонуклеотидов делает их доступным инструментом изучения различных биохимических процессов. Перспективность использования этих соединений в молекулярно-биологических исследованиях также стимулирует интерес к созданию на их основе новых модифицированных производных с заданными химическими, физико-химическими и биологическими свойствами [1].

Одним из возможных типов производных на основе модифицированных олигонуклеотидов являются олигомеры, содержащие алифатические аминогруппы [2–5]. Такие олигонуклеотиды удобно использовать для последующего введения репортерных групп [2, 3], получения ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями [4, 5]. К настоящему времени стали коммерчески доступными модифицированные синтоны, позволяющие получать олигонуклеотиды с 5'- и 3'-концевыми аминогруппами (ClonTech, Glen Research).

Настоящая работа продолжает исследования, связанные с синтезом олигонуклеотидов, модифицированных по углеводному фрагменту, и посвящена получению ранее не описанных олигоде-

зоксидеоксирибонуклеотидов, содержащих включения 9-(2'-амино-2'-дезоксидеокси-β-D-арабинофуранозил)аденина, а также изучению их химических и физико-химических свойств.

Наличие 2'-амино-2'-дезоксидеоксирибонуклеозидов в составе олигонуклеотидов повышает устойчивость к действию экзонуклеаз [6]. Высокая реакционная способность 2'-аминогрупп в олигомерах продемонстрирована в реакциях с электрофильными реагентами [7]. В связи с этим чрезвычайно интересным представляется синтез модифицированных олигодезоксидеоксирибонуклеотидов, содержащих 9-(2'-амино-2'-дезоксидеокси-β-D-арабинофуранозил)аденин.

Ранее нами было показано [7], что включение 2'-амино-2'-дезоксидеоксипиримидиновых нуклеозидов в олигонуклеотиды обуславливает понижение термодинамической стабильности ДНК-дуплексов. Мы надеемся, что сравнение свойств ДНК-дуплексов с включениями 2'-амино-2'-дезоксидеокси-арабино-нуклеозидов (инверсия заместителей при С2'-атоме углеводного остатка) и ДНК-дуплексов, содержащих 2'-амино-2'-дезоксидеоксирибонуклеозиды, позволит корректно определить влияние конфигурации С2'-центра на стабильность ДНК-дуплекса.

В работах [4, 5] нами были описаны олигонуклеотидные дуплексы, тяжи которых соединены между собой ковалентными связями. Для соединения цепей дуплекса была выбрана реакция между 2'-аминогруппой углеводного фрагмента,

Сокращения: aAⁿ – 2'-амино-2'-дезоксидеокси-арабино-аденозин (9-(2'-амино-2'-дезоксидеокси-β-D-арабинофуранозил)аденин). Префикс "d" при обозначении нуклеозидов и олигонуклеотидов 2'-дезоксидеоксиарабино-аденозина опущен.

* Автор для переписки.

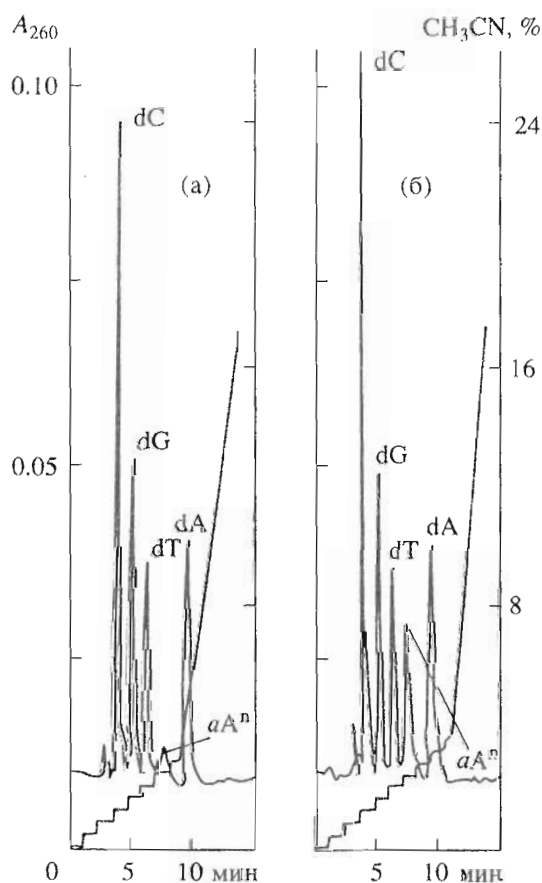


Рис. 1. Анализ продуктов гидролиза смесью щелочной фосфатазы и фосфодиэстеразы змеиного яда методом обращенно-фазовой ВЭЖХ: (а) – олигодезоксирибонуклеотида (III); (б) – его же, но с добавлением 2'-амино-2'-дезоксид-арабино-аденозина (aA^n) в качестве контроля. Условия см. "Экспер. часть".

находящейся в одном из тяжей, и карбоксильной группой, локализованной на нуклеозидной вставке в комплементарной цепи. Эта реакция приводила к образованию амидной связи между цепями. В данном случае приходится считаться с определенным искажением геометрии двойной спирали и снижением ее прочности, что связано с нарушением водородных связей в паре, где отсутствует одно из гетероциклических оснований. Решить эти проблемы можно, сохранив комплементарную пару в месте образования связи, например если реакция будет протекать между алифатической аминогруппой 2'-амино-2'-дезоксид-арабино-аденозина, локализованного в одном из тяжей, и карбоксильной функцией, полученной при ацилировании ангидридом дикарбоновой кислоты 2'-амино-2'-дезоксинуклеотида комплементарной цепи. Поэтому актуально получение олигонуклеотидов, содержащих 2'-амино-2'-дезоксид-арабино-производные пуриновых нуклеозидов, и изучение их свойств.

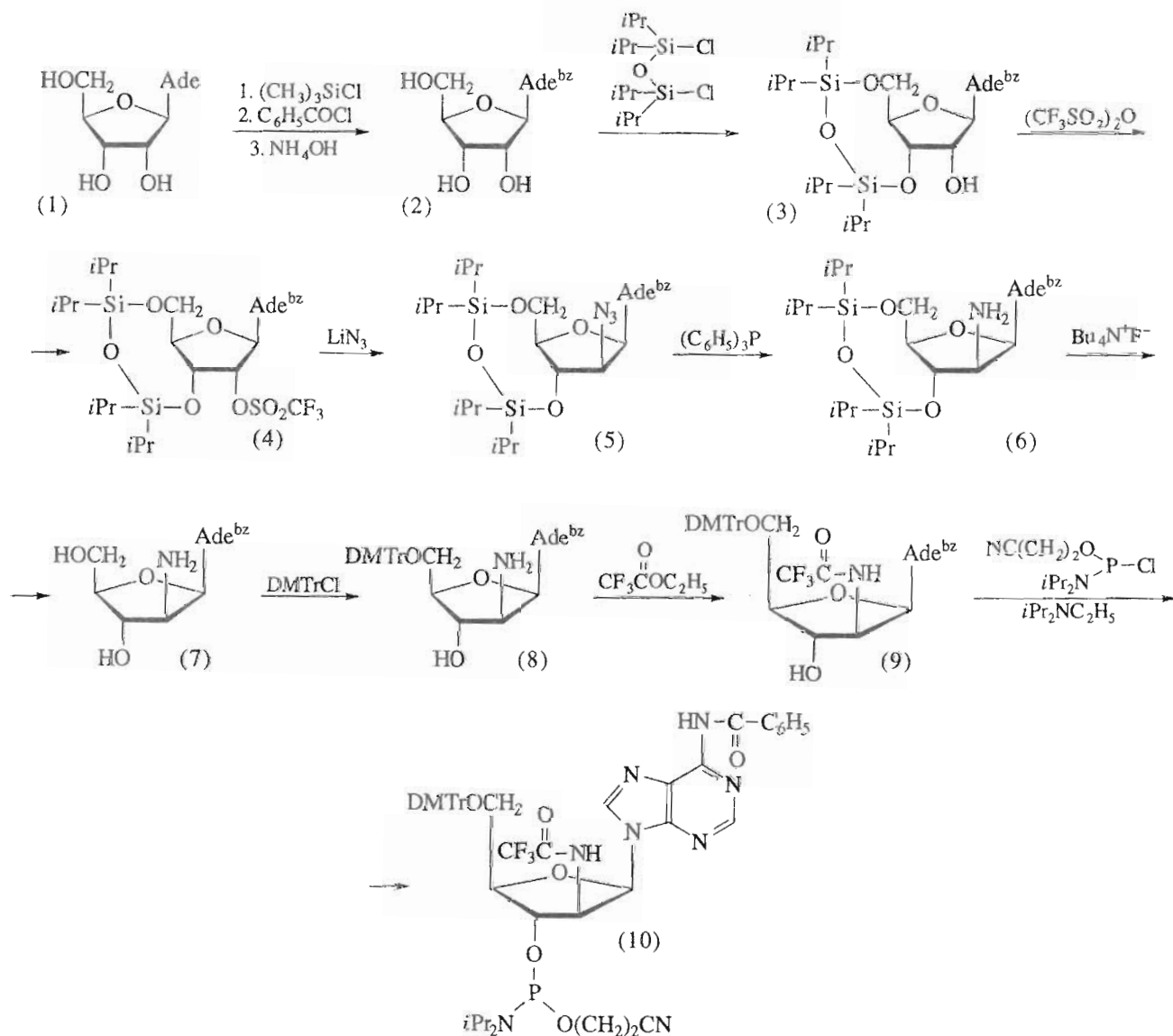
Первым этапом в синтезе олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 2'-амино-2'-дезоксид-арабино-аденозин, является выбор оптимального метода получения его модифицированного амидофосфитного производного, которое может быть встроено в любое положение олигомерной цепи с минимальными изменениями стандартного регламента олигодезоксирибонуклеотидного синтеза.

Синтез 3'-(N,N-диизопропиламидо)- β -цианэтилфосфита 9-(5'-O-диметокситриэтил-2'-трифтороацетида-2'-дезоксид- β -D-арабинофуранозил)-N⁶-бензоиладенина (см. схему 1) включает в себя ряд последовательных превращений: бензоилирование экзотрициклической аминогруппы аденозина (1); селективное силилирование 5'- и 3'-гидроксильных групп N⁶-бензоиладенозина (2) с использованием 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисулfoxана (TIPDS-Cl₂, реагент Маркевича); активацию 2'-гидроксила соединения (3) введением трифторметансульфогруппы, нуклеофильное замещение 2'-трифторметансульфонилосигруппы 5',3'-O,N⁶-блокированного аденозина (4) азид-ионом в диметилформамиде с обращением конфигурации заместителей при C2'-атоме, восстановление азидогруппы в нуклеозиде (5) трифенилфосфином с образованием производного 2'-амино-2'-дезоксид-арабино-аденозина (6); удаление защиты Маркевича тетрабутиламмонийфторидом в тетрагидрофуране; блокирование 5'-гидроксила соединения (7) диметокситриэтильной защитной группой. Алифатическую аминогруппу защищали этиловым эфиром трифторуксусной кислоты, а фосфитилирование соединения (9) осуществляли β -цианэтил-N,N-диизопропиламидохлорфосфитом по методике [8].

Данная последовательность проведения реакций была обусловлена тем, что трифтороацетильная группа щелочелабильна и в случае ее введения до удаления силильной защиты происходило бы одновременное удаление защитных групп 5',3'-гидроксилов арабинозы и 2'-аминогруппы, так как в условиях реакции десилилирования образуется сильное основание – гидроксид тетрабутиламмония.

В результате восстановления соединения (5) трифенилфосфином по методике [9], успешно применяемой нами для получения 2'-амино-2'-дезоксипиридинных нуклеозидов, как показал ТСХ-анализ реакционной смеси, кроме соединения (6) образуется побочный продукт, строение которого определить не удалось.

Схема 1.



При восстановлении азидогруппы трифенилфосфином в тетрагидрофуране и гидролизе промежуточно образующегося иминофосфорана водой при нагревании [9] вместо использовавшегося в работе [9] аммиака образование побочного продукта не наблюдалось и с высоким выходом был получен защищенный 2'-амино-2'-дезоксирибино-аденозин (6). Невысокий выход в реакции ацилирования 2'-аминогруппы соединения (6) этиловым эфиром трифторуксусной кислоты объясняется, по-видимому, стерической затрудненностью данной аминогруппы для электрофильной атаки.

Таким образом, нами разработан препаративный метод синтеза 3'-(N,N-диизопропиламидо)-β-цианэтилфосфита 9-(5'-O-диметокситритил-2'-

трифторацетиамидо-2'-дезокс-β-D-арабинофуранозил)-N⁶-бензоиладенина (10) (см. схему 1).

Полученное модифицированное производное (10) вводилось в автоматический твердофазный амидофосфоритный олигонуклеотидный синтез по стандартному регламенту на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 380B (США) с увеличением до 20 мин времени конденсации на стадии включения модифицированного звена в олигомерную цепь.

Степень превращения на стадии присоединения к растущей цепи модифицированного синтона была несколько меньше, чем при присоединении стандартных 3'-амидофосфитов 2'-дезоксирибонуклеозидов, и составляла около 90%. Вероятно, это связано со стерическими препятствиями, ко-

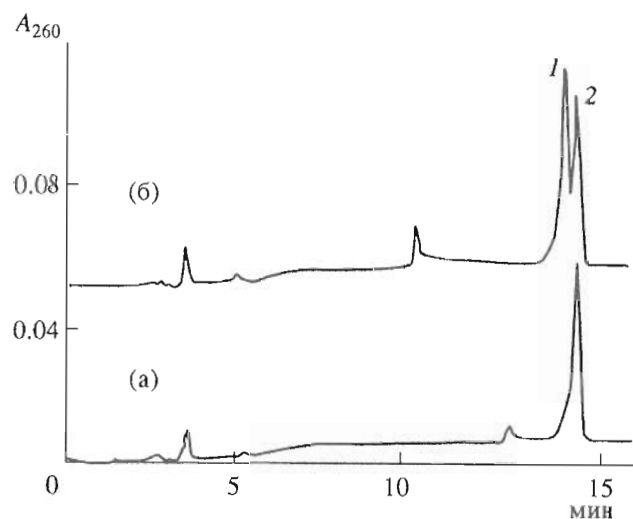


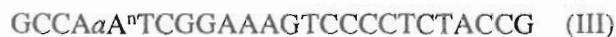
Рис. 2. ВЭЖХ-анализ (ион-парный вариант): (а) – реакционной смеси, полученной после ацилирования олигодезоксирибонуклеотида (I) уксусным ангидридом; (б) – этой же смеси, но с добавлением в качестве контроля исходного олигодезоксирибонуклеотида (1 – исходный олигодезоксирибонуклеотид (I), 2 – продукт его ацилирования). Условия см. “Экспер. часть”.

которые создает введенная в 2'-положение сахарного кольца трифторацетамидная группировка.

Защитные группы с гетероциклических оснований в модифицированных олигонуклеотидах удаляли по стандартной методике и продукты выделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, используя гидрофобные свойства 5'-О-диметокси-

тримильной группы, с последующим детритилированием целевых олигонуклеотидов.

Нами были синтезированы следующие олигодезоксирибонуклеотиды (5' → 3'):



Олигонуклеотид (I) – модельное соединение, на котором отрабатывались условия синтеза. Нуклеотидные последовательности олигомеров (II) и (III) были выбраны с учетом синтезированных ранее олигонуклеотидов с включениями 2'-амино-2'-дезоксипиримидиновых нуклеозидов [5, 7] с целью дальнейшего корректного сравнения свойств модифицированных дуплексов обоих типов.

Нуклеозидный состав соединений (I)–(III) подтверждали их исчерпывающем гидролизом до нуклеозидов смесью фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы в течение 3 ч при 37°C с последующим анализом гидролизата методом ВЭЖХ и сравнением с контрольными смесями нуклеозидов. При гидролизе модифицированных олигонуклеотидов было получено пять пиков, из которых четыре соответствовали природным нуклеозидам, а пятый – 2'-амино-2'-дезокси-арабино-аденозину. Соотношение пиков и последовательность выхода компонентов смеси соответствовали расчетным данным. В качестве примера на рис. 1 приведен профиль хроматографического разделения продуктов ферментативного гидролиза олигонуклеотида (III).

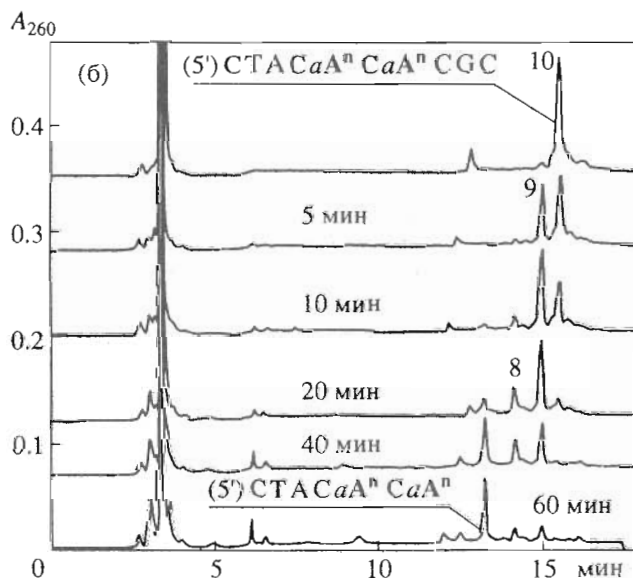
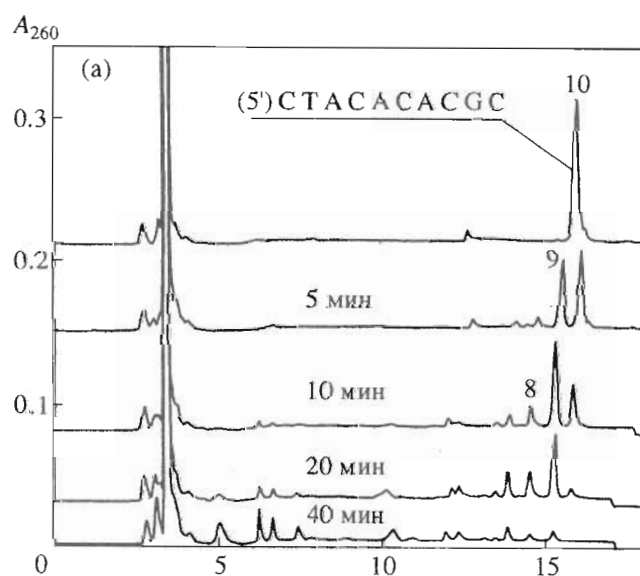


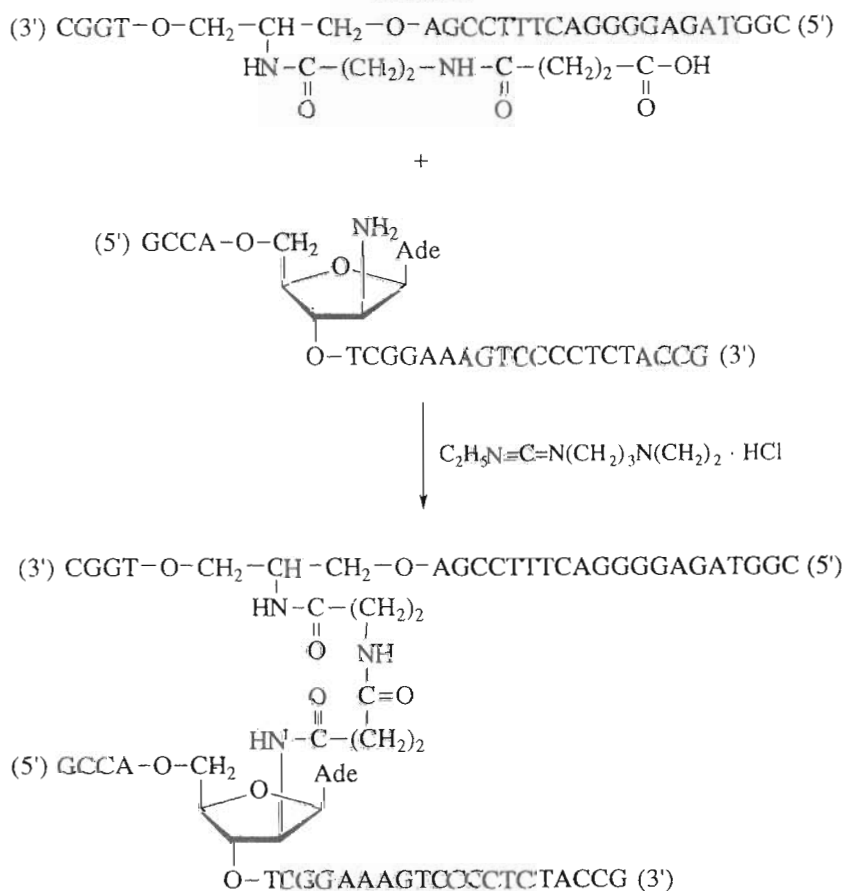
Рис. 3. ВЭЖХ-анализ (ион-парный вариант) продуктов гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда: (а) – немодифицированного олигонуклеотида (V); (б) – модифицированного олигонуклеотида (II). Цифры над пиками соответствуют длинам олигонуклеотидов. Условия см. “Экспер. часть”.

Нами было подтверждено наличие 2'-амино-группы в олигонуклеотидах и была показана ее высокая реакционная способность в реакциях ацилирования. Так, при действии на олигонуклеотид (I) уксусного ангидрида в боратном буферном растворе (pH 8.6), а на олигонуклеотид (III) янтарного ангидрида в 0.25 М бикарбонатном буферном растворе (pH 8.0) в обоих случаях были получены продукты, отличающиеся от исходного олигонуклеотида со свободной 2'-аминогруппой по времени удерживания при анализе методом

обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте (например, см. рис. 2).

Нами была продемонстрирована возможность осуществления реакции между цепями олигонуклеотидного дуплекса, составленного из модифицированных олигонуклеотидов, в котором одна из цепей содержит 2'-амино-2'-дезокси-арабиноаденозин, а вторая – карбоксильную группу, локализованную на нуклеозидной вставке (схема 2). Реакцию проводили аналогично [4, 5]. Выход ДНК-дуплекса с ковалентно связанными цепями составил 55%.

Схема 2.



Термодинамическая устойчивость дуплекса, образованного модифицированным олигонуклеотидом (II) и комплементарным олигонуклеотидом (IV), была изучена методом УФ-спектроскопии (таблица). Для сравнения с модифицированным дуплексом была исследована термодинамическая устойчивость немодифицированного дуплекса, образованного той же ДНК-матрицей (IV) и комплементарным ей олигонуклеотидом (V). Структуры олигонуклеотидов и образуемых ими дуплексов, их температуры плавления и значения гипохромии приведены в таблице.

Было обнаружено, что наличие 2'-амино-2'-дезокси-арабиноаденозина в составе олигонуклеотида обуславливает некоторое понижение температуры плавления ДНК-дуплекса по сравнению с немодифицированным аналогом. Так, температура плавления дуплекса В (40°C) оказалась на 13°C ниже температуры плавления соответствующего немодифицированного дуплекса А. Сравнение влияния включений 2'-амино-2'-дезоксисуридина и 2'-амино-2'-дезокси-арабиноаденозина на термодинамическую устойчивость дуплекса показало, что последний вносит меньшие искажения в структуру ДНК-дуплекса (температура

Некоторые характеристики модифицированных ДНК-дуплексов

Шифр	ДНК-дуплекс	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$ (± 1)	$h, \%$ (± 1)
А	(V) 5' С T A C A C A C G C	53	14
	(IV) 3' G G A T G T G T G C G T		
В	(V) 5' С T A C a A ⁿ C a A ⁿ C G C	40	13
	(IV) 3' G G A T G T G T G C G T		

плавления дуплекса с 2'-амино-2'-дезоксиридиновыми вставками была на 19°C ниже температуры плавления природного дуплекса [7]).

Нами была исследована устойчивость модифицированного олигонуклеотида (II) к действию фосфодиэстеразы змеиного яда по сравнению с немодифицированным аналогом (V). При анализе методом ион-парной ВЭЖХ было обнаружено, что ферментативный гидролиз (V) (рис. 3а) в выбранных условиях (см. "Экспер. часть") протекает с большой скоростью, при этом происходит промежуточное появление олигонуклеотидных фрагментов различной длины, которые подвергаются дальнейшему ферментативному гидролизу. Характер ферментативного гидролиза олигонуклеотида (II), содержащего два модифицированных звена, принципиально иной (рис. 3б). В подобранных условиях полный ферментативный гидролиз модифицированного олигонуклеотида (II) не происходит за 60 мин в отличие от его немодифицированного аналога. Наблюдается накопление 7-звенного олигонуклеотида – продукта частичного гидролиза, содержащего модифицированное звено на 3'-конце. Его дальнейший ферментативный гидролиз протекает очень медленно. Это свидетельствует о том, что 2'-амино-2'-дезоксид-арабино-аденозин существенно затрудняет действие экзонуклеаз.

Таким образом, в настоящей работе предложен метод введения 2'-амино-2'-дезоксид-арабино-аденозина в олигонуклеотидную цепь в процессе автоматического амидофосфитного синтеза. Показана высокая реакционная способность 2'-аминогрупп олигонуклеотидов в реакциях ацилирования. Результаты изучения физико-химических свойств олигонуклеотидного дуплекса, в состав которого входит 2'-амино-2'-дезоксид-арабино-аденозин, показывают, что включение модифицированных звеньев в олигонуклеотиды не препятствует образованию ДНК-дуплекса, хотя и понижает его термодинамическую устойчивость по сравнению с немодифицированным аналогом. Показано, что предложенная модификация повышает устойчивость олигонуклеотидов к действию гидролизующих ферментов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 5'-О-диметокситриэтил-3'-(N,N-диизопропиламино)-β-цианэтилфосфиты 2'-дезоксирибонуклеозидов (Applied Biosystems, США); аденозин, триметилхлорсилан, тетрабутил-аммонийфторид, триэтиламин, N-метилимидазол, трихлоруксусную кислоту (Fluka, Швейцария); тетразол (Pharmacia, ФРГ); N-этилдиизопропиламин, диметокситриэтилхлорид, трифенилфосфин, уксусный ангидрид, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (Merck, ФРГ); 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисилоксан, фосфодиэстеразу змеиного яда, щелочную фосфатазу (Sigma, США); ангидрид трифторметансульфокислоты, β-цианэтил-N,N-диизопропиламинохлорфосфит (Aldrich, США). Этиловый эфир трифторуксусной кислоты и азид лития были получены по методикам [11, 12] соответственно.

ТСХ осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) с использованием следующих систем растворителей: хлороформ – этанол, 9 : 1 (А); хлороформ – этилацетат, 8 : 2 (Б); хлороформ – этанол, 95 : 5 (В); хлороформ – триэтиламин, 99 : 1 (Г). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле марки Silicagel L40/100 (Chemapol, Чехо-Словакия), а также Kieselgel 60 (230–400 меш, Merck, ФРГ) в системах растворителей: градиент концентрации метанола (0 → 5%) в хлороформе (а); градиент концентрации этилацетата (0 → 5%) в хлороформе (б).

¹H-ЯМР-Спектры регистрировали на приборе VXR-400 (Varian, США) в CDCl₃, используя CHCl₃ как внутренний стандарт. Приведены химические сдвиги (δ, м.д.) и константы спин-спинового взаимодействия (J, Гц). ИК-Спектры записывали на спектрофотометре UR-20 (Германия). Оптическое поглощение и УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. За молярный коэффициент поглощения олигонуклеотидов принимали сумму коэффициентов составляющих мононуклеотидов. Использовали эквимолярные смеси компонентов. Кривые температурной зависимости УФ-поглощения регистрировали на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония), снабженном термостатированным кюветодержателем и блоком для измерения температуры, при непрерывном повышении температуры со скоростью 0.5°C/мин.

N⁶-Бензоиладенозин (2) синтезировали с выходом 72% так, как описано в работе [13].

5',3'-О-(Тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-N⁶-бензоиладенозин (3) получали из соединения (2) по методике [13] с выходом 80%; R_f 0.5 (А).

5',3'-О-(1,1,3,3-Тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-2'-О-трифторметансульфонил-N⁶-бензоиладенозин (4) получали согласно [14]. 3.5 г (5.8 ммоль) 5',3'-О-(тетраизопропилдисилоксан-

1,3-диил)-N⁶-бензоиладенозина (3) высушивали упариванием в вакууме с абс. пиридином (3 × 10 мл), растворяли в смеси 96 мл абс. хлористого метилена и 12 мл абс. пиридина, затем добавляли по каплям при перемешивании и охлаждении раствор ангидрида трифторметансульфонокислоты (1.9 мл, 11.5 ммоль) в 9 мл абс. хлористого метилена. После окончания реакции через 3 ч (ТСХ-контроль в системе Б) в реакционную смесь добавляли 10 мл воды. Далее реакционную смесь растворяли в 100 мл хлороформа и промывали водой (3 × 50 мл). Объединенные органические вытяжки сушили над прокаленным сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывали, реакционную смесь концентрировали в вакууме и хроматографировали на колонке с силикагелем в системе растворителей (б). Выход соединения (4) 3.2 г (75%), R_f 0.5 (Б). ¹H-ЯМР-спектр: 6.21 (с, 1H, H-1'), 5.80 (уш. д, 1H, H-2', $J_{2,3}$ 4.7), 5.25 (дд, 1H, H-3', $J_{3,4}$ 9.28), 4.15 (м, 1H, H-4'), 4.08 (дд, 1H, H-5'a, $J_{5'a,5'b}$ 13.18, $J_{4',5'a}$ 2.68), 4.20 (дд, 1H, H-5'b, $J_{4',5'b}$ 1.70).

9-(5',3'-О-(1,1,3,3-Тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-2'-азидо-2'-дезоксид-β-D-арабинофуранозил)-N⁶-бензоиладенин (5). 3.2 г (4.3 ммоль) 5',3'-О-(тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-2'-О-трифторметансульфонил-N⁶-бензоиладенозина (4) высушивали упариванием в вакууме с абс. пиридином (3 × 10 мл), растворяли в 86 мл смеси диметилформамид – диоксан (1 : 1) и добавляли 2 г (41 ммоль) азида лития. После окончания реакции через 4 ч (ТСХ-контроль в системе Б) реакционную смесь упаривали до масла, растворяли в 100 мл хлороформа и промывали водой (3 × 50 мл). Объединенные органические вытяжки сушили над прокаленным сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывали, реакционную смесь концентрировали в вакууме и хроматографировали на колонке с силикагелем в системе растворителей (а). Выход соединения (5) 2.4 г (88%), R_f 0.23 (Б). ИК-спектр (KBr, ν, см⁻¹): 2120 (N₃), 1666, 1616 (C=O). ¹H-ЯМР-спектр: 6.52 (д, 1H, H-1', $J_{1,2}$ 6.72), 4.50 (дд, 1H, H-2', $J_{2,3}$ 8.56), 4.63 (т, 1H, H-3', $J_{3,4}$ 8.45), 3.95 (м, 1H, H-4'), 4.07 (дд, 1H, H-5'a, $J_{5'a,5'b}$ 13.13, $J_{4',5'a}$ 2.98), 4.21 (дд, 1H, H-5'b, $J_{4',5'b}$ 3.06).

9-(5',3'-О-(1,1,3,3-Тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-2'-амино-2'-дезоксид-β-D-арабинофуранозил)-N⁶-бензоиладенин (6) синтезировали аналогично [10]. 2.4 г (3.8 ммоль) 9-(5',3'-О-(1,1,3,3-тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-2'-азидо-2'-дезоксид-β-D-арабинофуранозил)-N⁶-бензоиладенина (5) высушивали упариванием в вакууме с абс. пиридином (3 × 10 мл), растворяли в 50 мл тетрагидрофурана и добавляли 2.5 г (9.5 ммоль) трифенилфосфина. Реакционную смесь перемешивали с помощью магнитной мешалки при комнатной температуре. Через 2 ч к реакционной смеси добавляли 3 мл воды и перемешивали еще 10 ч при 50°C. Полноту прохождения реакции

контролировали методом ТСХ в системе В. Реакционную смесь упаривали до масла, растворяли в 100 мл этилацетата и промывали водой (3 × 50 мл). Объединенные органические вытяжки сушили над прокаленным сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывали, реакционную смесь концентрировали в вакууме и хроматографировали на колонке с силикагелем в системе растворителей (а). Выход соединения (6) 1.9 г (80%), R_f 0.28 (В).

Соединение (6) десилилировали так, как описано в работе [15]. Тритилирование соединения (7) проводили по методике [16]. Выход 9-(5'-О-диметокситритил-2'-амино-2'-дезоксид-β-D-арабинофуранозил)-N⁶-бензоиладенина (8) 68% (на две стадии), R_f 0.4 (В). УФ-спектр соединения (8) (EtOH, nm): λ_{max} 279, λ_{min} 256. ¹H-ЯМР-спектр: 6.33 (д, 1H, H-1', $J_{1,2}$ 6.54), 3.74 (м, 1H, H-2'), 4.36 (т, 1H, H-3', $J_{2,3}$ 7.69, $J_{3,4}$ 7.69), 4.02 (м, 1H, H-4'), 3.43 (дд, 1H, H-5'a, $J_{5'a,5'b}$ 10.65, $J_{4',5'a}$ 4.48), 3.52 (дд, 1H, H-5'b, $J_{4',5'b}$ 3.47).

9-(5'-О-Диметокситритил-2'-трифторацетиамидо-2'-дезоксид-β-D-арабинофуранозил)-N⁶-бензоиладенин (9) получали из соединения (8) по методике [7] с выходом 20%, R_f 0.5 (В). ¹H-ЯМР-спектр: 6.48 (д, 1H, H-1', $J_{1,2}$ 6.60), 4.80 (м, 1H, H-2'), 5.10 (т, 1H, H-3', $J_{2,3}$ 7.69, $J_{3,4}$ 7.69), 4.18 (м, 1H, H-4'), 3.48 (м, 2H, H-5'a, H-5'b), 8.72 (д, 1H, NH-2', $J_{NH-2',H-2}$ 5.1).

3'-О-(N,N-Диизопропиламидо)-β-цианэтилфосфит 9-(5'-О-диметокситритил-2'-трифторацетиамидо-2'-дезоксид-β-D-арабинофуранозил)-N⁶-бензоиладенин (10) получали фосфитилированием соединения (9) аналогично [8] с выходом 95%, R_f 0.53 (Г).

Автоматический твердофазный синтез олигодезоксирибонуклеотидов (I)–(V) осуществляли амидофосфитным методом на ген-синтезаторе Applied Biosystems 380B (США) с использованием коммерческих реагентов и растворителей по стандартному регламенту с увеличением времени конденсации на стадии присоединения модифицированных звеньев до 20 мин, использовали растворы модифицированных амидофосфитов в абс. ацетонитриле с концентрацией 0.15 М. В качестве полимерных носителей использовали Small Scale dN-CPG Applied Biosystems (США) с удельной загрузкой первым нуклеозидным звеном 24 мкмоль/г. Концентрация 3'-амидофосфитных производных немодифицированных 2'-дезоксирибонуклеозидов в ацетонитриле составляла 0.1 М. Синтез олигонуклеотида с нуклеозидной вставкой (см. схему 2) описан в работе [5].

Делocking олигонуклеотидов после синтеза, анализ реакционных смесей, выделение олигонуклеотидов и определение их нуклеозидного состава проводили так, как описано в работе [7].

Ацилирование олигонуклеотида (I) уксусным ангидридом и олигонуклеотида (III) янтарным ангидридом осуществляли по методике [4].

ДНК-дуплексы с ковалентно связанными цепями получали по методике [4]: по 0.1 ОЕ₂₆₀ комплементарных олигонуклеотидов растворяли в 37 мкл буферного раствора (0.05 М MES-буфер, рН 5.5; 0.02 М MgCl₂), нагревали до 95°C, медленно охлаждали до комнатной температуры и добавляли 37 мкл 0.4 М раствора 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида в том же буфере. Реакцию вели 72 ч при 20°C. Реакционные смеси анализировали и продукты выделяли методом ион-парной ВЭЖХ в условиях, приведенных в работе [7].

Ферментативный гидролиз. 0.2 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотидного материала и 1.0 ОЕ₂₆₀ уридина растворяли в 18 мкл 0.2 М трис-НСI-буфера (рН 8.5), содержащего 0.04 М MgCl₂ · 6H₂O, и добавляли 2 мкл фосфодиэстеразы змеиного яда (1.0 × 10⁻⁴ ед. акт./мл). Реакционную смесь инкубировали при 37°C. Через определенные промежутки времени отбирали пробы объемом по 4 мкл, реакцию в которых останавливали охлаждением жидким азотом. Продукты гидролиза анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ (ион-парный вариант) на хроматографе Waters (США) с шагом элюции 2 нуклеотидных звена в 1 мин. Условия аналитического разделения описаны в работе [7].

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (96-04-50397) и программы "Университеты России" (uni-011-95), подраздел "Фундаментальные исследования в химии".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goodchild J. // *Bioconj. Chem.* 1990. V. 1. P. 165–187.
2. Roget A., Bazin H., Teoule R. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. P. 7643–7651.
3. Agrawal S., Zamecnik P.C. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 5419–5423.
4. Antsyrovich S.I., Oretskaya T.S., Volkov E.M., Romanova E.A., Tashlitsky V.N., Blumenfeld M., Shabarova Z.A. // *Nucleosides Nucleotides.* 1996. V. 15. P. 923–936.
5. Анцыпович С.И., Орецкая Т.С., Романова Е.А., Волков Е.М., Таулицкий В.Н., Вассер М., Шабарова З.А. // *Биоорганическая химия.* 1996. Т. 22. С. 264–268.
6. Pieken W.A., Olsen D.B., Benseler F., Aurup H., Eckstein F. // *Science.* 1991. V. 253. P. 314–317.
7. Кузнецова Л.Г., Романова Е.А., Волков Е.М., Таулицкий В.Н., Орецкая Т.С., Крынецкая Н.Ф., Шабарова З.А. // *Биоорганическая химия.* 1996. Т. 19. С. 455–466.
8. Barone A.P., Tang I.U., Caruthers M.N. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. P. 4051–4061.
9. Mungall W.S., Greene G.L., Heavner G.A., Letsinger R.L. // *J. Org. Chem.* 1975. V. 40. P. 1659–1662.
10. Staudinger H., Meyer J. // *J. Helv. Chem. Acta.* 1919. V. 2. P. 635–646.
11. Гудлицкий М. *Химия органических соединений фтора.* М.: ГХИ, 1961. С. 134, 174–175.
12. Hoth W., Pyl G. // *Z. Angew. Chem.* 1929. V. 42. P. 888–891.
13. van Boom J.H., Wreemann C.T.J. // *Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach* // Ed. M.J. Gait. Oxford; Washington: IRL Press, 1984. P. 153–182.
14. Herdewijn P.A.M. // *J. Org. Chem.* 1988. V. 53. P. 5050–5053.
15. Sproat B.S., Lamond A.I. // *Oligonucleotides and Analogues: a Practical Approach* // Ed. F. Eckstein. Oxford, New York; Tokyo: IRL Press, 1991. P. 49–87.
16. Jones R.A. // *Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach* // Ed. M.J. Gait. Oxford; Washington: IRL Press, 1984. P. 23–34.

Synthesis of Modified Oligodeoxyribonucleotides Containing 9-(2'-Amino-2'-Deoxy-β-D-Arabinofuranosyl)Adenine

E. M. Zubin, S. I. Antsyrovich, T. S. Oretskaya, E. A. Romanova,
E. M. Volkov, V. N. Tashlitskii, and Z. A. Shabarova

Chemical Faculty, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

Abstract—A method for preparing a modified derivative of 2'-amino-2'-deoxy-arabino-adenosine ready for directed insertion into an oligonucleotide chain during solid-phase synthesis was elaborated. A series of the title oligonucleotides (6-25-mers) containing a 2'-amino-2'-deoxy-arabino-adenosine fragment were prepared. A high reactivity of the 2'-amino group during the acylation with carboxylic acid anhydrides was demonstrated. It was shown that the insertion of the modified fragments into oligonucleotides did not inhibit the formation of the DNA duplex.

Key words: modified oligonucleotides, 9-(2'-amino-2'-deoxy-β-D-arabinofuranosyl)adenine.