



УДК 577.113.4

## РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ФОСФОТИОАТНЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ. III\*. СИНТЕЗ 3'- И 5'-ФОСФАМИДНЫХ АЛКИЛИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ФОСФОТИОАТНЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ АРОМАТИЧЕСКИЙ ОСТАТОК АЗОТИСТОГО ИПРИТА

© 1999 г. Н. В. Амирханов<sup>#</sup>, Н. В. Неронова,  
Ю. Я. Маркушин, В. И. Ямковой\*, В. Ф. Зарытова

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

\*Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Поступила в редакцию 05.08.98 г. Принята к печати 19.10.98 г.

Синтезированы фосфотиоатные аналоги олигонуклеотидов (ФТАО), содержащие на 3'- или 5'-конце свободную фосфатную группу. На их основе получены реакционноспособные производные ФТАО, несущие на 3'- или 5'-концевом фосфате алкилирующий остаток *N*-метил-4-(*N*-метил-*N*'-2-хлорэтил-амино)бензиламина ( $\text{HN}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{RCl}$ ). На примере RCl-производных тетра-, окта- и додекадезоксирибо-ФТАО показано, что в ходе синтеза и выделения таких реагентов алкилирующая группа сохраняет реакционную способность по отношению к нуклеофилам. Для полученных 5'-RCl-производных ФТАО оценена константа скорости ионизации C–Cl-связи ( $k_0 (3.12 \pm 0.32) \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ ) – лимитирующей стадии взаимодействия с нуклеофилами.

*Ключевые слова:* олигонуклеотиды, фосфотиоатные аналоги; фосфотриэфирный синтез; алкилирующие производные.

Фосфотиоатные аналоги олигонуклеотидов (ФТАО) – это аналоги природных олигонуклеотидов, у которых атом кислорода в межнуклеотидных фосфодиэфирных группах заменен на атом серы. Такая замена обуславливает проявление ряда отличительных свойств ФТАО как в химическом [2–4], так и в физико-химическом [5–8] аспектах, а также в плане их биологической активности [5, 9–13]. Особый интерес к ФТАО возник после того, как была обнаружена их высокая активность против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [14–18].

Реакционноспособные производные ФТАО потенциально могут обладать большей биологической активностью по сравнению с исходными

немодифицированными ФТАО, поскольку такие соединения способны образовывать ковалентные сшивки с различными биополимерами, в том числе и нуклеиновыми кислотами.

Благодаря хиральности межнуклеотидных фосфотиоатных центров ФТАО образуют диастереомеры, обладающие различной хроматографической подвижностью при обращенно-фазовой хроматографии [7, 8]. Число таких центров возрастает с увеличением длины олигонуклеотидной цепи ФТАО, поэтому в ходе синтеза различных, в том числе и реакционноспособных, производных ФТАО длиной более чем 2–3 нуклеотидных звена могут возникать определенные трудности, связанные с идентификацией и выделением целевых продуктов.

При синтезе и использовании реагентов на основе ФТАО наличие высококонкулофильных межнуклеотидных фосфотиоатных групп (ps) может привести к дополнительным осложнениям, связанным с возможностью модификации ps-групп под действием реакционноспособной группировки, вводимой в состав ФТАО, что, в свою очередь, может снизить выход целевого продукта.

\* Сообщение II см. [1].

Сокращения: ФТАО – фосфотиоатные аналоги олигонуклеотидов; ps – межнуклеотидный фосфотиоатный остаток;  $\text{HN}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{RCl}$  – *N*-метил-4-(*N*-метил-*N*'-2-хлорэтиламино)бензиламин; DMTr – диметокситритил; CNEt – 2-цианэтил; TBS-Cl – 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид; Melm – *N*-метилимидазол;  $(\text{PyS})_2$  – 2,2'-дипиридилдисульфид; TCA – трихлоруксусная кислота; НК – нуклеиновая кислота; DMAPr – диметиламинопропил. Префикс "d" в обозначении дезоксирибонуклеотидов опущен.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

Проявление этих особенностей ФТАО, вероятно, является причиной того, что в настоящее время исследовано небольшое число реакционно-способных [1, 19–22], в том числе алкилирующих [1, 21, 22], производных ФТАО.

Ранее [22] на примере ди- и тритимидилатов, содержащих межнуклеотидные фосфотиоатные группы, мы показали принципиальную возможность синтеза алкилирующих производных ФТАО. Однако для направленного воздействия на НК необходимы более протяженные, гетерогенные последовательности нуклеотидов в реакционноспособных производных ФТАО, способные образовывать устойчивые комплексы с комплементарной НК-мишенью.

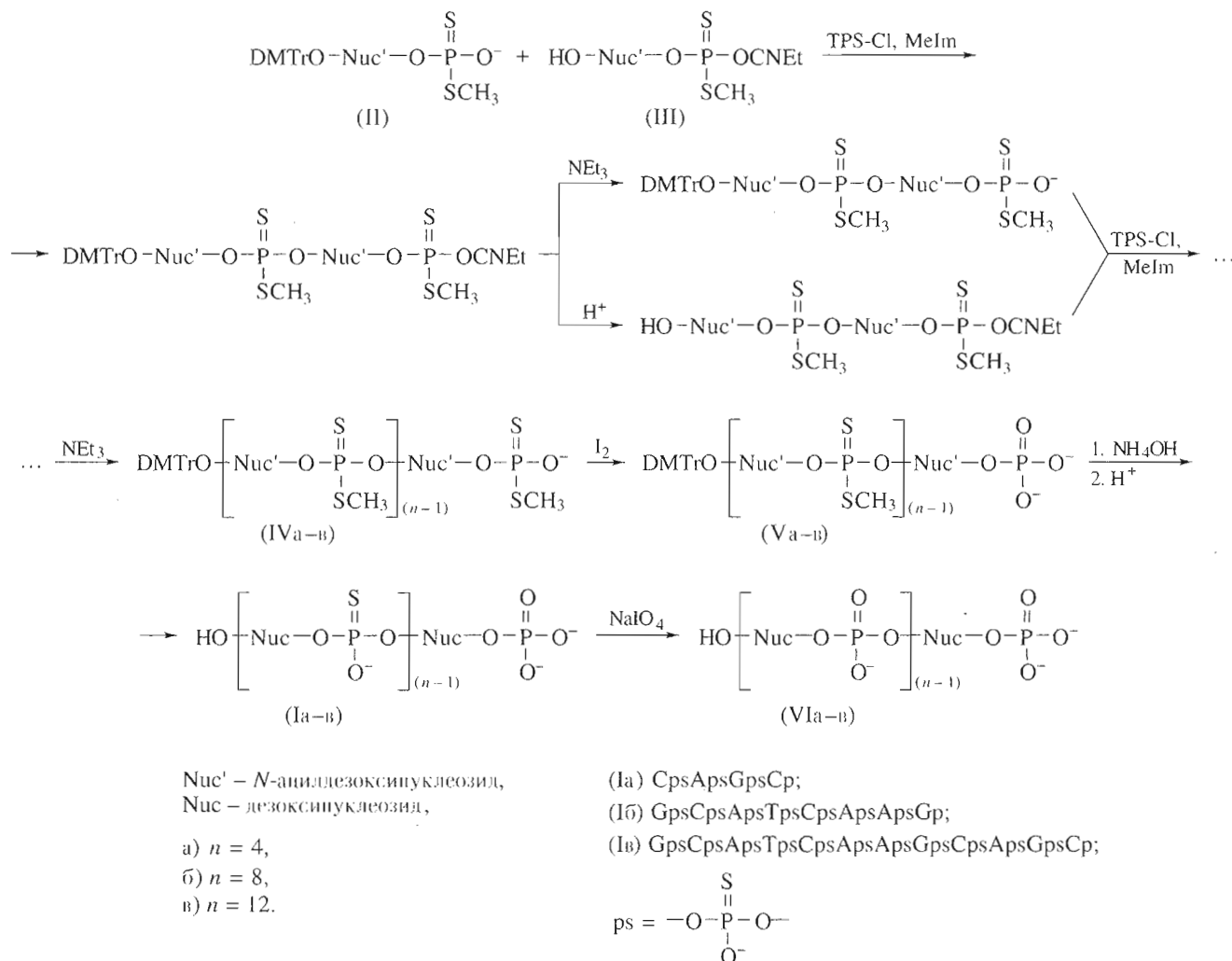
Цель настоящей работы – синтез 3'- и 5'-фосфатсодержащих производных ФТАО гетерогенного состава и получение на их основе алкилирующих производных ФТАО, содержащих остаток

*N*-метил-4-(*N*'-метил-*N*'-2-хлорэтиламино)бензил-амина ( $\text{HN}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{RCl}$ ).

На первом этапе работы был осуществлен синтез базовых ФТАО (Ia–v) (см. схему 1), содержащих свободную фосфатную группу на 3'-конце цепи.

Синтез соединений (Ia–v) проводили по модифицированному фосфотриэфирному методу [23], блочным способом в растворе, исходя из соответствующих защищенных *N*-ацилдезоксинуклеозид-3'-(*S*-метил)фосфодитиоатных мономеров (II) (*P*-компонент) [24, 25] и (III) (*OH*-компонент) с использованием в качестве конденсирующего реагента смеси TPS-Cl и *N*-метилимидазола [26] в абсолютном пиридине (схема 1).

Были получены защищенные 5'-*O*-диметокситритил-*N*-ацил-*S*-метилтетра-, окта- и додекануклеотидфосфодитиоаты (IVa), (IVб) и (IVв), 3'-концевую *S*-метилдитиофосфодиэфирную группу



В соединениях (IVa–v)–(VIa–v) нуклеотидная последовательность соответствует таковой в (Ia)–(Iв).

Схема 1.

Хроматографические характеристики олигонуклеотидов и их производных

Олигонуклеотиды и их производные	Номера соединений	τ, мин	
		ИОХ*	ОФХ*
Диэфирные			
CAGCp	(VIa)	13.4	13.4
GCATCAAGp	(VIб)	16.6	16.3
GCATCAAGCAGCp	(VIв)	20.6	16.8
GCATCAAGCAGCp(N(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> RCI)	(X)	18.9	20.9
3'-Фосфаты ФТАО			
CpsApsGpsCp	(Ia)	12.5	15.3–18.2**
GpsCpsApsTpsCpsApsApsGp	(Iб)	17.2	18.1–21.8**
GpsCpsApsTpsCpsApsApsGpsCpsApsGpsCp	(Iв)	21.1	19.8–24.2**
ФТАО			
CpsApsGpsC	(VIIa)	8.1	–
GpsCpsApsTpsCpsApsApsGpsCpsApsGpsC	(VIIв)	17.5	–
5'-Фосфаты ФТАО			
pCpsApsGpsC	(VIIIa)	12.3	17.5–19.4**
pGpsCpsApsTpsCpsApsApsGpsCpsApsGpsC	(VIIIв)	20.4	20.9–25.3**
3'-Модифицированные производные ФТАО			
GpsCpsApsTpsCpsApsApsGp(N(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> RCI)	(IXб)	–	20.4–24.4**
GpsCpsApsTpsCpsApsApsGpsCpsApsGpsCp(N(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> RCI)	(IXв)	–	21.8–26.6**
5'-Модифицированные производные ФТАО			
(CIRCH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ))pCpsApsGpsC	(XIa)	–	24.9–27.0**
(CIRCH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ))pGpsCpsApsTpsCpsApsApsGpsCpsApsGpsC	(XIв)	–	23.1–29.3**

\* ИОХ – ионообменная хроматография, ОФХ – обращенно-фазовая хроматография. Условия см. "Эксперимент. часть".

\*\* Смесь диастереомеров.

которых избирательно окисляли до фосфомоноэфирной (соединения (V)) обработкой йодом (80–100 экв. I<sub>2</sub> в водном пиридине, 15–30 мин, 20°C). Таким образом, использование мономеров с 3'-S-метилдитиофосфатной группой позволило исключить дополнительный синтез 3'-концевых 3'-O,N-диацилнуклеозидных мономеров и стадию фосфорилирования для введения в состав ФТАО 3'-концевой фосфатной группы.

Последующая обработка соединений (Va–v) водным аммиаком приводит к снятию метилсульфидных групп наряду с удалением N-ацильных защитных групп. После удаления защитных DMTr-групп были получены целевые ФТАО (Ia–v) с 3'-концевой фосфатной группой, выходы которых по данным ионообменной хроматографии составили соответственно 79, 44 и 24%.

Следует отметить, что аналогичная модификация триэфирного метода синтеза олигонуклеотидов ранее нами была использована для синтеза 3'-фосфатсодержащих ди- и тритимидилфосфотиоатов TrpTr и TrpTrpTr [22]. Однако в качестве исходных мономеров в работе [22] использовали не фосфодитиоатные, как в данном случае, а фосфомонотиоатные производные (DMTr)Nuc'-OP(O)(SMe)OH. При этом выход целевых фосфо-

тиоатов резко снижался с увеличением длины синтезируемой цепи. Это обусловлено относительно высокой степенью разрыва межнуклеотидных связей в процессе удаления метильных групп с межнуклеотидных фосфомонотиоатных остатков при обработке тиофенолом, которая, по данным <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии, составляла 15–20% в расчете на одну межнуклеотидную связь [22]. В случае же синтеза ФТАО по приведенной выше схеме из фосфодитиоатных мономеров, степень разрыва межнуклеотидных связей при удалении метилсульфидных групп обработкой соответствующих триэфиров (V) концентрированным водным раствором аммиака по данным <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии составляет не более 1% на одну межнуклеотидную связь (данные не приведены).

При окислении соединений (Ia–v) водным раствором NaIO<sub>4</sub> [27] были получены соответствующие немодифицированные олигодезоксирибонуклеотиды CAGCp (VIa), GCATCAAGp (VIб) и GCATCAAGCAGCp (VIв) с природными межнуклеотидными фосфодиэфирными группами, использованные нами в качестве контрольных соединений.

Ранее было отмечено, что наличие межнуклеотидных фосфотиоатных групп в олигонуклеоти-

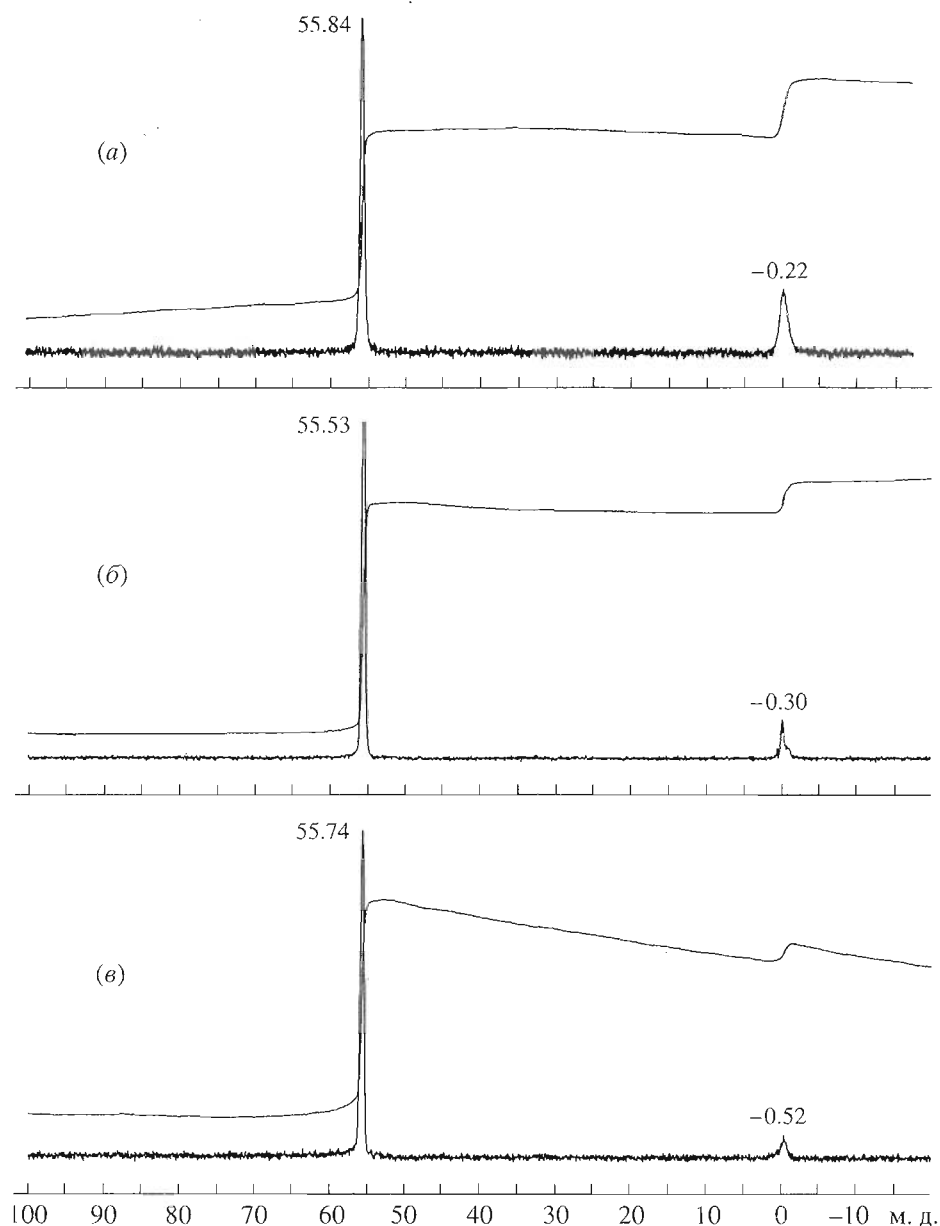


Рис. 1.  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектры 3'-фосфатов тетра- (Ia) (а), окта- (Iб) (б) и додекануклеотидфосфатов (Iв) (в) в водном буфере, содержащем 30% MeOH и 0.05 М триэтиламмоний-ацетат (pH 6.5).

дах приводит к значительным осложнениям при их выделении ионообменной хроматографией на традиционно используемых сильноосновных анионообменных сорбентах [27–29], когда неспецифическая сорбция препятствует выделению протяженных ФТАО, в особенности содержащих на 3'- или 5'-конце свободную фосфатную группу. В связи с этим для очистки ФТАО (Ia–в), имеющих концевую фосфатную группу, был использован слабоосновный анионообменный сорбент (АС-80 DMAPr) отечественного производства, который представляет собой широкопористую силикагелевую матрицу (на основе силохрома АС-80) с диметил-

аминопропильными (DMAPr) функциональными группами. Следует отметить, что времена удерживания полученных ФТАО (Ia–в) при ионообменной хроматографии на таком сорбенте, в отличие от хроматографии на другом, традиционно используемом, сильноосновном анионообменном сорбенте Полисил СА (данные не приведены), приближаются к временам удерживания фосфодиэфирных олигонуклеотидов (VIa–в) той же нуклеотидной последовательности (таблица). После выделения соединений (Ia–в) были охарактеризованы с использованием  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии (рис. 1),

ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ (таблица).

Время удерживания полученных ФТАО (Ia–в) по данным ионообменной хроматографии возрастает с увеличением длины олигонуклеотидной цепи (таблица). При обращенно-фазовой ВЭЖХ ФТАО (Ia–в) элюируются в виде смеси диастереомеров, время удерживания которых больше, чем у соответствующих природных олигонуклеотидов (VIa–в). Данные <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии (рис. 1) указывают на присутствие в исследуемых соединениях межнуклеотидной тиофосфатной (δ 55–56 м.д. по данным [30]) и концевой фосфатной (δ –1.3...+0.4 м.д. [31]) групп в соотношении, близком к расчетному (для (Ia), (Iб) и (Iв) соответственно 3 : 1.02, 7 : 1.12 и 11 : 1.18). Наличие 3'-концевого фосфата в полученных соединениях (Ia–в) дополнительно подтверждали путем количественного 3'-дефосфорилирования с помощью щелочной фосфатазы (ср., например, времена удерживания при ионообменной хроматографии для соединений (Ia) и (VIIa), (Iв) и (VIIв) в таблице).

Способность полученных соединений образовывать комплементарные комплексы проверяли путем термической денатурации (плавления) соответствующих комплементарных комплексов. Было найдено, что температура плавления комплексов соединений (Iб), (Iв), (VIб) или (VIв) с олигонуклеотидом d(TGCCTGGAGCTGCTTGATGCC), содержащим соответствующие комплементар-

ные участки, составляет 23.6, 52.5, 32.6 и 58.5°C, соответственно. Наблюдается закономерное увеличение стабильности комплементарных комплексов с увеличением длины олигонуклеотида, причем, как и следовало ожидать, фосфотиоатные олигонуклеотиды (Iб) или (Iв) образуют менее прочный комплекс, чем соответствующие фосфодиэфирные контрольные олигонуклеотиды (VIб) или (VIв). Образование комплементарных комплексов в случае тетра-нуклеотидов (Ia) или (VIa) зарегистрировано не было. Эти данные находятся в согласии с описанными ранее физико-химическими свойствами и характеристиками ФТАО [5].

Для получения ФТАО, несущих 5'-концевую фосфатную группу, было осуществлено препаративное дефосфорилирование ФТАО (Ia, в), имеющих 3'-фосфатный остаток с последующим кинированием образующихся ФТАО (VIIa, в) (см. схему 2 и таблицу). Для препаративного кинирования ФТАО был выделен и использован высококонцентрированный препарат Т4-поли-нуклеотидкиназы (40–100 ед. акт./мкл) [32]. Кинирование ФТАО (VIIa, в) с использованием такого препарата фермента проходило с выходами 90–95% с образованием целевых 5'-фосфорилированных олигонуклеотидфосфотиоатов (VIIIa, в) (рис. 2, таблица).

Далее полученные производные (Iб, в) и (VIIIa, в) были использованы для синтеза конъюгатов, содержащих реакционноспособную группу RCl как

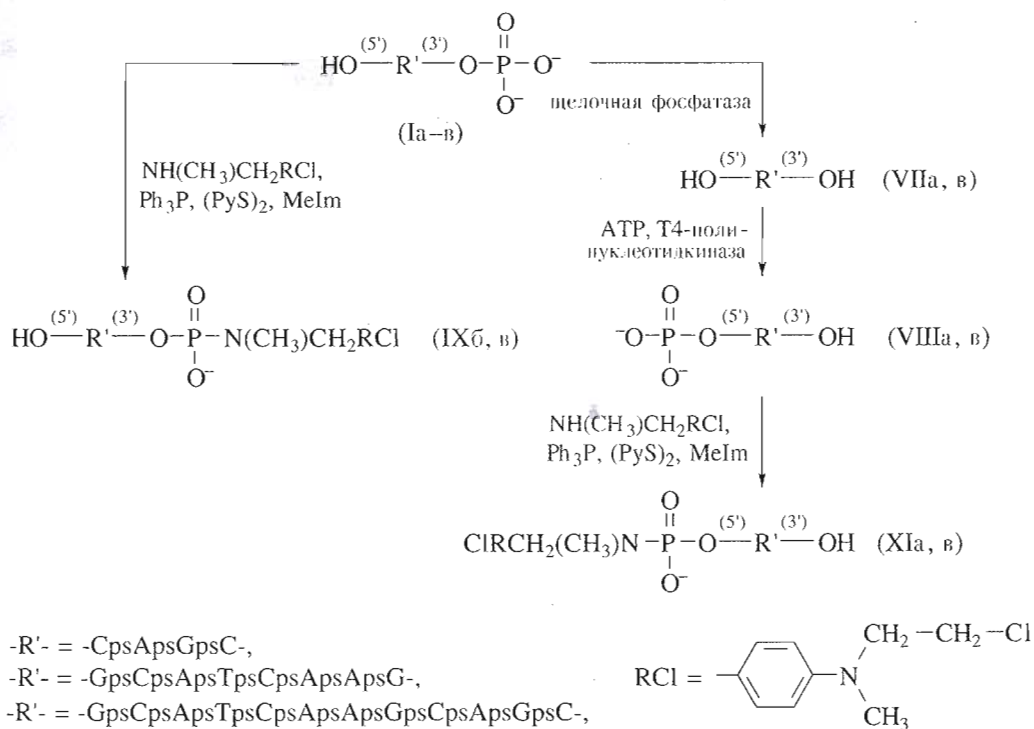


Схема 2.

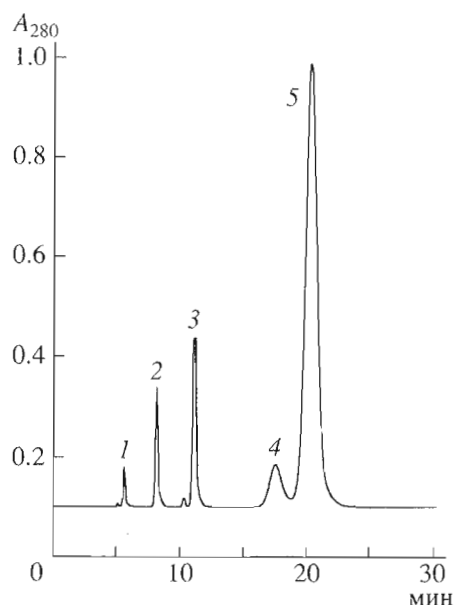


Рис. 2. Профиль ионообменной ВЭЖХ реакционной смеси, полученной при 5'-фосфорилировании додекануклеотидфосфотиоата (VIIIb) с помощью АТР в присутствии Т4-полинуклеотидкиназы. Условия фосфорилирования и хроматографии приведены в "Экспериментальной части". 1 – АМР; 2 – АДР; 3 – АТР; 4 – (VIIIb); 5 – целевой 5'-фосфат додекануклеотидфосфотиоата (VIIIb).

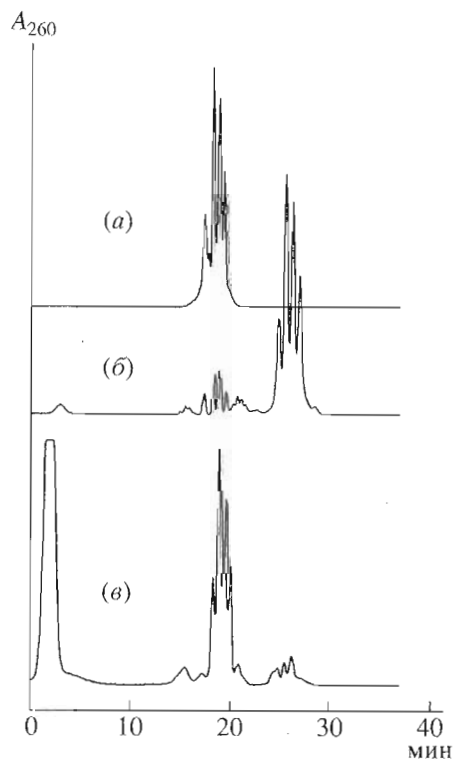


Рис. 3. Профиль обращенно-фазовой ВЭЖХ тетра-нуклеотидфосфотиоата (VIIIa) (а), реакционной смеси, полученной при синтезе его 5'-RCl-производного (XIa) (б) и смеси, полученной после реакции реагента (XIa) с 1 М Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (37°C, 12 ч) (в).

на 3'- (соединения (IXб,в) и (X)), так и на 5'-концевом фосфате (соединения (XIа, в)) (схема 2, таблица).

Введение *N*-метил-4-(*N*-метил-*N'*-2-хлорэтил-амино)бензиламина по 3'- или 5'-свободной фосфатной группе ФТАО осуществляли в присутствии трифенилфосфина, дипиридилдисульфида и MeIm. Ранее нами было показано, что в таких условиях межнуклеотидные фосфотиоатные группы не затрагиваются [22].

Как видно из схемы 2, оба типа алкилирующих производных могут быть получены из одного олигонуклеотида, содержащего 3'-концевую фосфатную группу.

Синтезированные алкилирующие производные выделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ. Регистрация нескольких (рис. 3б) или уширенных (рис. 4б) пиков при обращенно-фазовой хроматографии вероятно обусловлена наличием диастереомеров в исходных ФТАО и их производных. Выходы алкилирующих производных по данным хроматографии составили 80–90%. Из рис. 3 и 4 и данных таблицы видно, что относительные времена удерживания синтезированных RCl-производных возрастают по сравнению с временем удерживания исходных ФТАО.

Способность к алкилированию полученных производных олигонуклеотидфосфотиоатов оценивали по реакции с тиосульфатом [33] (см., например, рис. 3в). Максимальный выход реакции алкилирования тиосульфата во всех случаях был не ниже 90%. Это свидетельствует о том, что в ходе синтеза и выделения RCl-производных ФТАО алкилирующая группа сохраняет свою высокую реакционную способность.

На основании данных обращенно-фазовой хроматографии, полученных при алкилировании тиосульфата реагентом (XIа), была построена кинетическая кривая накопления продуктов алкилирования тиосульфата (рис. 5а). Линейный вид кинетической кривой в полулогарифмических координатах (рис. 5б) свидетельствует о том, что реакция описывается кинетическим уравнением первого порядка. Константа скорости лимитирующей стадии алкилирования–ионизации С–Cl-связи ( $k_0$ ) [34, 35] при 37°C для реагента (XIа), определенная по этим данным, составила  $(3.12 \pm 0.32) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ . Следует отметить, что найденное нами значение  $k_0$  для 5'-модифицированного реагента (XIа) практически не отличается от значения  $k_0$ , определенного ранее для 3'-модифицированных реагентов на основе ФТАО ( $k_0 (3.71 \pm 0.22) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  [1]) и аналогичных реагентов на основе природных олигонуклеотидов ( $k_0 (3.36 \pm 0.3) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  [36]) при 37°C. Таким образом, как в случае 3'-, так и для 5'-модифицированных конъюгатов, наличие ps-групп в олигонуклеотиде не влияет на константу скорости лимитирующей стадии алкилирования.

Полученные в настоящей работе алкилирующие производные ФТАО, содержащие остаток азотистого иприта как на 3'-, так и на 5'-конце, способные образовывать достаточно устойчивые комплексы с комплементарными участками НК и обладающие реакционной способностью по отношению к нуклеофилам среды, были использованы для аффинной модификации НК (результаты будут представлены в следующем сообщении).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы 5'-*O*-диметокситри-тил-*N*-ацилнуклеозиды, 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, 1,2,4-триазол – отечественного производства; *N*-метилимидазол (Serva, Германия), трифенилфосфин (Chemapol, Чехия), 2,2'-дипиридилдисульфид (Sigma, США), дихлор-*S*-метилдитиофосфат Cl<sub>2</sub>P(S)(SMe) [37], щелочная фосфатаза из клеток *E. coli*, выделенная по методу [38]. Т4-Полинуклеотидкиназу, выделенную по методу [32], хранили (-20°C) и использовали в виде концентрированного раствора (40–100 ед. акт./1 мкл) в буфере, содержащем 0.02 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>–КОН, 0.1 М КСl, 5 мМ дитиотреит, 50 мкМ АТР, 50% глицерин, рН 7.5. *N*-Метил-4-(*N'*-метил-*N'*-2-хлорэтил-амино)бензиламин (гидрохлорид) любезно предоставлен Т.М. Ивановой (НИБХ СО РАН).

Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L40/100 (Chemapol, ЧСФР), ТСХ – на пластинках Kieselgel F 60 254 (Merck, Германия) в системах: А – хлороформ–метанол (9.5 : 0.5), Б – хлороформ–метанол (9 : 1), В – хлороформ–метанол–триэтиламин (9 : 1 : 0.1). ВЭЖХ проводили с использованием хроматографов Waters (США); ионообменную хроматографию – на смоле АС-80 DMAPr (“Теоретическая практика”, Россия), размер частиц 10–12 мкм (колонка 4.6 × 250 мм) в градиенте концентрации КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (0 → 0.3 М за 30 мин), рН 6.5, в 30% СН<sub>3</sub>CN при скорости элюции 2 мл/мин; обращенно-фазовую – на смоле Li-chrosorb RP-18 (Merck, Германия), размер частиц 15–20 мкм (колонка 4.6 × 250 мм) в градиенте концентрации ацетонитрила (0 → 30% за 30 мин) в 0.05 М LiClO<sub>4</sub> при скорости элюции 1 мл/мин.

<sup>31</sup>P-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре АС-200 (Bruker, Германия) при 25°C; внешний стандарт 85% Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub>.

Термическую денатурацию олигонуклеотидных дуплексов проводили в 0.01 М Трис-НСl-буфере (рН 7.4), содержащем 0.2 М NaCl, 1 мМ EDTA (концентрация комплексов 1 × 10<sup>-5</sup> М), при длине волны 260 нм на установке с терморегулируемой оптической кюветой на базе УФ-детектора жидкостного хроматографа “Милихром” (Россия). Скорость нагрева образцов не превышала 0.7–1°C/мин.

**Удаление диметокситригильной защиты (общая методика).** Полностью защищенные моно-, ди- или олигонуклеотиды обрабатывали 80% ук-

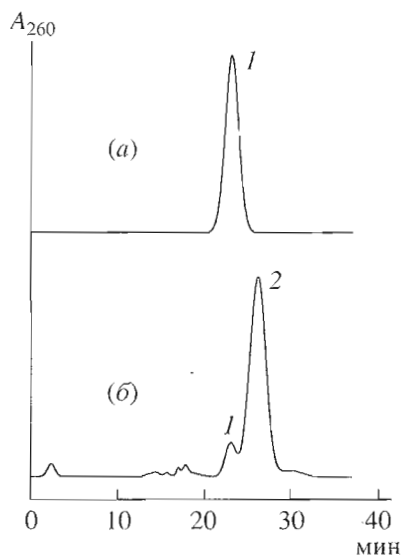


Рис. 4. Профиль обращенно-фазовой ВЭЖХ додекануклеотидфосфотриата (VIIIb) (а) и реакционной смеси, полученной при синтезе его 5'-RCl-производного (XIb) (б). 1 – (VIIIb); 2 – (XIb).

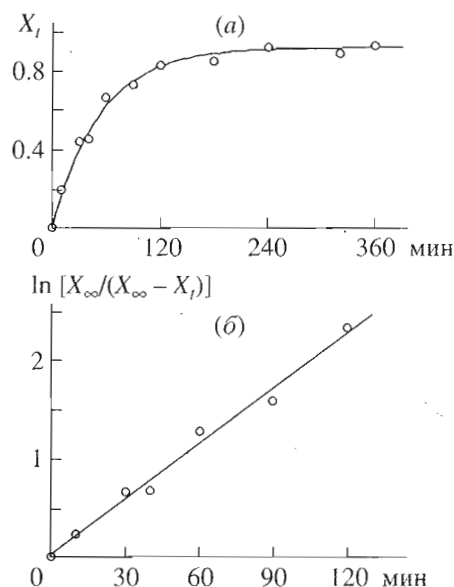


Рис. 5. Кинетическая кривая накопления продуктов алкилирования, полученных при выдерживании реагента (XIa) в 1 М водном Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> при 37°C (а), и ее полулогарифмическая анаморфоза (б). Xi – текущая доля продуктов алкилирования, X<sub>∞</sub> – доля продуктов алкилирования при выдерживании реагента более 6 ч.

сусной кислотой (4–6 ч) либо 10% ТСА в хлороформе (5–15 мин) при комнатной температуре аналогично ранее описанной методике [23]. За ходом реакции следили по данным ТСХ в системах А или Б. В случае применения уксусной кислоты после завершения реакции смесь упаривали, а в случае ТСА – реакционную смесь нейтрализовали

пиридином и промывали водой. Целевые продукты выделяли колоночной хроматографией на силикагеле. Фракции, содержащие целевые продукты, упаривали, растворяли в хлороформе и осаждали в гексан или эфир. Выходы целевых соединений 70–95%.

**Цианэтильную защиту** удаляли по методике, аналогичной ранее описанной [23]. Полностью защищенные олигонуклеотидные блоки (0.1–0.5 ммоль) растворяли в 10–20 мл смеси пиридин–триэтиламин–вода (2 : 2 : 1), выдерживали 40 мин при 20°C, упаривали, растворяли в хлороформе и осаждали в гексан или эфир. Удаление цианэтильной защиты по данным ТСХ (система Б) – количественное.

**5'-О-Диметокситритил-N-ацилнуклеозид-3'-(S-метил)дитиофосфаты: (DMTr)Tps(SMe) (IIa), (DMTr)C<sup>bz</sup>ps(SMe) (IIб), (DMTr)A<sup>bz</sup>ps(SMe) (IIв) и (DMTr)G<sup>ib</sup>ps(SMe) (IIг)** были получены аналогично известным литературным методикам [23–25] из соответствующих 5'-О-диметокситритил-N-ацилнуклеозидов (0.1 М), используемых в качестве фосфорилирующего реагента дихлор-S-метилдитиофосфат Cl<sub>2</sub>P(S)(SMe) [37] (2 экв.) в присутствии 1,2,4-триазола (5 экв.) в среде абсолютного пиридина (0°C, 1 ч). Выходы целевых соединений (IIa), (IIб), (IIв) и (IIг) составили соответственно 95, 89, 82 и 79%. <sup>31</sup>P-ЯМР (пиридин): (IIa) – δ 74.33 и 74.52 м. д. (диастереомеры), (IIб) – δ 74.57 и 74.78 м. д., (IIв) – δ 74.75 и 75.14 м. д., (IIг) – δ 74.86 и 75.23 м. д.

**Tps(SMe,CNEt) (IIIa), C<sup>bz</sup>ps(SMe,CNEt) (IIIб), A<sup>bz</sup>ps(SMe,CNEt) (IIIв) и G<sup>ib</sup>ps(SMe,CNEt) (IIIг)** получены путем триэфирной конденсации соответствующих мономеров (IIa), (IIб), (IIв) или (IIг) (0.2 М) с 2-цианэтанолом (2 экв.) в присутствии смеси TPS-Cl (3 экв.) и N-метилимидазола (9 экв.) в абсолютном пиридине (20°C, 30 мин) с последующим удалением диметокситритильных защит 10% ТСА в хлороформе (для С- или А-содержащих мономеров) или 80% уксусной кислотой (для Т- или G-содержащих мономеров) в условиях общей методики. Выходы целевых соединений (IIIa), (IIIб), (IIIв) и (IIIг) составили соответственно 92, 85, 80 и 75%. <sup>31</sup>P-ЯМР (пиридин): (IIIa) – δ 95.56 и 95.74 м. д. (диастереомеры), (IIIб) – δ 95.80 и 95.98 м. д., (IIIв) – δ 95.68 и 95.85 м. д., (IIIг) – δ 95.98 и 96.14 м. д.

**Синтез защищенных N-ацил-S-метилтетра-, окта- и додекануклеотидфосфодитиоатов (IVa), (IVб) и (IVв)** проводили по стандартной триэфирной блочной схеме из соответствующих мономерных блоков (IIa–г) и (IIIa–г), последовательной конденсацией соответствующего P- и OH-компонента (схема 1) в присутствии TPS-Cl и MeIm в пиридине. Выходы продуктов конденсаций составляли 60–90%. Время реакции 15–40 мин (контроль по ТСХ в системах А или Б). Нуклеотидный (0.1 М) и нуклеозидный компоненты, TPS-Cl с MeIm использовали в соотношении 1 : 0.9 : 3 : 9.

**3'-Фосфатсодержащие олигонуклеотидфосфотиоаты (Ia), (Iб) и (Iв).** Защищенный N-ацил-S-метилтетрануклеотидфосфодитиоат (IVa) (110 мг, 50 мкмоль) обрабатывали 5 ммоль йода в 10 мл смеси пиридина с водой (4 : 1). Через 40 мин (контроль по ТСХ в системе В) реакционную смесь разбавляли 20 мл воды и избыток йода удаляли экстракцией эфиром. По данным <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии наблюдается полное окисление 3'-концевого MeS-дитиофосфата (-OP(S)(SMe)OH) (исчезновение сигналов в области 74–76 м. д., ср. [24, 26]) до свободного фосфата (-OP(O)(O<sup>-</sup>)O<sup>-</sup>) (сигналы в области 0.3–1.6 м.д. [31]), межнуклеотидные MeS-дитиофосфаты (-OP(S)(SMe)O-) при этом не затрагиваются (сигналы в области 93–96 м. д. [24–26]). Далее реакционную смесь упаривали и обрабатывали концентрированным раствором аммиака (60°C, 5 сут), упаривали, обрабатывали 80% уксусной кислотой для удаления диметокситритильной защитной группы (20°C, 30 мин), упаривали, растворяли в 30% водном ацетонитриле и проводили анионообменную хроматографию. Фракции вещества с наибольшим временем удерживания (основной продукт) собирали, упаривали и проводили обращенно-фазовую хроматографию в вышеприведенных условиях. Фракцию, содержащую продукт (Ia), упаривали, растворяли в 1 мл 50% водного ацетона и осаждали в 10 мл 2% раствора LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. Осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном и высушивали. Получено 1310 OE<sub>260</sub> целевого соединения (Ia). Аналогично, из 76 мг соединения (IVб) и 112 мг соединения (IVв) были получены соответственно 640 OE<sub>260</sub> ФТАО (Iб) и 510 OE<sub>260</sub> ФТАО (Iв). Данные <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии и относительные времена удерживания полученных соединений приведены соответственно на рис. 1 и в таблице.

**3'-Фосфатсодержащие тетра-, окта- и додекануклеотиды (VIa), (VIб) и (VIв)** получали по методу [27] окислением соответствующих тетра-, окта- и додекануклеотидфосфотиоатов (Ia), (Iб) и (Iв) 0.1 М водным раствором NaIO<sub>4</sub> (20°C, 40 мин). Целевые олигонуклеотиды (VIa), (VIб) и (VIв) выделяли последовательной ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией. Конечные выходы целевых соединений (VIa), (VIб) и (VIв) составили соответственно 81, 63 и 51%. Хроматографические характеристики полученных соединений приведены в таблице.

**Препаративное 3'-дефосфорилирование олигонуклеотидфосфотиоатов** проводили аналогично методу [39]. 300 мкл реакционной смеси, содержащей 0.05 М Трис-НСl (рН 8.0), 0.015 М MgCl<sub>2</sub>, 0.5–1 мкмоль 3'-фосфатсодержащего олигонуклеотидфосфотиоата и 3000 ед. акт. щелочной фосфатазы, инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Далее фермент удаляли трижды, экстрагируя реакционную смесь 300 мкл смеси фенола (насыщенного 0.1 М Трис-НСl (рН 8.0)) с хлороформом, 1 : 1 [39]. Избыток фенола удаляли экстракцией



хлороформом (5 × 300 мкл). Дефосфорилированный продукт выделяли ионообменной хроматографией. Конечный выход 3'-дефосфорилированного продукта 85–90%.

**Препаративное 5'-фосфорилирование олигонуклеотидфосфотиоатов.** К 300 мкл реакционной смеси, содержащей 0.05 М Трис-НСl (рН 9.6), 0.01 М MgSO<sub>4</sub>, 5 мМ дитиотреит, 20 мкМ спермидин, 0.1 мМ EDTA [40], 0.4–4 мМ 3'-дефосфорилированный олигонуклеотидфосфотиоат и 2–20 мМ АТР, добавляли 60–600 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы [32]. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 3 ч, затем при 20°C в течение 10–15 ч. Фосфорилированный продукт выделяли либо непосредственно ионообменной хроматографией (рис. 2), либо предварительно перед ионообменной хроматографией реакционную смесь обессоливали на обращенно-фазовой колонке, элюируя продукты 50% водным ацетонитрилом. Конечный выход фосфорилированного продукта 80–90%. Степень фосфорилирования олигонуклеотидфосфотиоатов по данным ионообменной хроматографии 90–95%.

**N-Метил-4-(N'-метил-N'-2-хлорэтиламино)бензилфосфамидные производные (IXб), (IXв), (XIа), (XIв) и (X).** К 50 ОЕ<sub>260</sub> соответствующего олигонуклеотидфосфотиоата, содержащего либо 3'-, либо 5'-фосфатные группы, в 50 мкл воды добавляли 25 мкл 8% водного раствора цетилтриметиламмонийбромида. Полученный раствор замораживали в жидком азоте, лиофилизовали до сухого остатка и сушили над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (10–15 ч, 20°C). Полученный рыхлый осадок растворяли в 50 мкл абс. диметилформамида и, согласно работе [41], последовательно добавляли 8.8 мг 2,2'-дипиридилдисульфида, 10 мкл свежеперегнанного N-метилмидазола и 10.4 мг трифенилфосфина. Через 10 мин в реакционную смесь добавляли раствор амина HN(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>Cl, приготовленного суспендированием 12 мг N-метил-4-(N'-метил-N'-2-хлорэтиламино)бензиламингидрохлорида, HN(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>Cl · HCl, с 15 мкл триэтиламина в 50 мкл DMF (5 мин, 20°C), с последующим отделением раствора свободного амина от выпавшего осадка триэтиламонийхлорида. Реакционную смесь после добавления амина выдерживали 1 ч при 20°C и осаждали олигонуклеотидное производное в 10–20 объемах 2% раствора LiClO<sub>4</sub> в ацетоне, осадок промывали ацетоном. Полученный реагент очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (см., например, рис. 3б и 4б). Выход реагента, по данным обращенно-фазовой хроматографии, 80–90%. Сразу после хроматографии раствор реагента упаривали в вакууме при 20–25°C, остаток растворяли в 300 мкл 50% водного ацетона и осаждали 10 объемами 2% LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. Осадок промывали ацетоном и сразу сушили над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> при 20°C в вакууме водоструйного насоса. Водные растворы реагента хранили в жидком азоте. При выделении реагента все операции проводили быстро, промежуточные растворы храни-

ли при 0°C. Реакционную способность полученных производных проверяли по реакции с тиосульфатом [33]. Реакции алкилирования тиосульфата протекали во всех случаях с выходами не ниже 90% (рис. 3в).

**Кинетика алкилирования тиосульфата реагентом (XIа).** Раствор 0.5 мкмоль реагента (XIа) в 1 мл 1 М водного тиосульфата натрия выдерживали при 37°C. Через определенные промежутки времени отбирали пробы (50 мкл) и анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила (0 → 50% за 25 мин) в 0.05 М LiClO<sub>4</sub> при скорости элюции 2 мл/мин при комнатной температуре. Время хроматографии 15–20 мин. Долю продуктов алкилирования вычисляли из площадей соответствующих пиков.

Авторы выражают глубокую благодарность А.С. Левиной за полезную дискуссию и ценные рекомендации при обсуждении результатов, В.В. Кандауровой и группе ЯМР-спектроскопии НИОХ СО РАН за помощь при регистрации ЯМР-спектров.

Работа финансировалась в рамках ГНТП по теме "Новейшие методы биоинженерии. Ген-направленные биологически активные вещества" и частично грантами МНТП "Биотехнология" № 3Н-124-94 и РФФИ № 96-04-5091.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф. // Биоорг. химия. 1997. Т. 23. С. 569–575.
2. Fidanza J.A., McLaughlin L.W. // J. Am. Chem. Soc. 1989. V. 111. P. 9117–9119.
3. Agrawal S., Zamecnik P.C. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 5419–5423.
4. Gut I.G., Beck S. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 1367–1373.
5. Stein C.A., Subasinghe C., Shinozuka K., Cohen J.S. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 3209–3221.
6. Kibler-Herzog L., Zon G., Uznanski B., Whittier G., Wilson W.D. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 2979–2986.
7. Murakami A., Tamura Y., Wada H., Makino K. // Anal. Biochem. 1994. V. 223. P. 285–290.
8. Wilk A., Stec W.J. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 530–534.
9. Eckstein F. // Ann. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 367–402.
10. Beaucage S.L., Iyer R.P. // Tetrahedron. 1993. V. 49. P. 1925–1963.
11. Uhlmann E., Peyman A. // Chem. Rev. 1990. V. 90. P. 543–584.
12. Власов В.В., Паутова Л.В., Рыкова Е.Ю., Якубов Л.А. // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 1247–1251.
13. Yaswen P., Stampfer M.R., Ghosh K., Cohen J.S. // Antisense Res. Dev. 1993. V. 3. P. 67–77.
14. Matsukura M., Shinozuka K., Zon G., Mitsuya H., Reitz M., Cohen J.S., Broder S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 7706–7710.

15. Matsukura M., Zon G., Shinozuka K., Stein C.A., Mitsuya H., Cohen J.S., Broder S. // *Gene*. 1988. V. 72. P. 343–347.
16. Matsukura M., Zon G., Shinozuka K., Robert-Guroff M., Shimada T., Stein C.A., Mitsuya H., Wong-Staal F., Cohen J.S., Broder S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 4244–4249.
17. Majumdar C., Stein C.A., Cohen J.S., Broder S., Wilson S. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 1340–1346.
18. Stein C.A., Matsukura M., Subasinghe C., Broder S., Cohen J.S. // *AIDS Res. Human Retroviruses*. 1989. V. 5. P. 639–646.
19. Lin M., Hultquist K.L., Oh D.H., Bayer E.A., Hoefler W.K. // *FASEB J*. 1995. V. 9. P. 1371–1377.
20. Faruqi A.F., Krawezuk S.H., Matteucci M.D., Glazer P.M. // *Nucl. Acids Res*. 1997. V. 25. P. 633–640.
21. Huh N., Rege A.A., Yoo B., Kogan T.P., Kohn H. // *Bioconjugate Chem*. 1996. V. 7. P. 659–669.
22. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф. // *Биоорган. химия*. 1995. Т. 21. С. 365–375.
23. Кумарев В.П., Баранова Л.В., Богачев В.С., Лебедев А.В., Обухова Л.В. // *Биоорган. химия*. 1986. Т. 12. С. 1348–1358.
24. Dahl B.H., Bjergarde K., Nielsen J., Dahl O. // *Tetrahedron Lett*. 1990. V. 31. P. 3489–3492.
25. Eldrup A.B., Bjergarde K., Felding J., Kehler J., Dahl O. // *Nucl. Acids Res*. 1994. V. 22. P. 1797–1804.
26. Yau E.K., Ma Yan-X., Caruthers M.H. // *Tetrahedron Lett*. 1990. V. 31. P. 1953–1956.
27. Agrawal S., Tang J.Y., Brown D.M. // *J. Chromatogr*. 1990. V. 509. P. 396–399.
28. Metelev V., Agrawal S. // *Anal. Biochem*. 1992. V. 200. P. 342–346.
29. Метелев В.Г., Таушлицкий В.Н., Агравал С. // *Биоорган. химия*. 1997. Т. 23. С. 742–746.
30. Hirschbein B.L., Fearon K.L. // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1997. V. 7. P. 55–61.
31. Лебедев А.В., Резвухин А.Н. // *Биоорган. химия*. 1983. Т. 9. С. 149–185.
32. Врацких Л.В., Гаевая Л.В., Комарова Н.И., Ямковой В.И. // *Биотехнология*. 1991. № 4. С. 50–53.
33. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Подыминовин М.А., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. С. 1212–1220.
34. Власов В.В., Гринева Н.И., Кнорре Д.Г. // *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук*. 1969. Вып. 1. С. 104–109.
35. Беликова А.М., Вахрушева Т.Е., Власов В.В., Гринева Н.И., Кнорре Д.Г., Курбатов В.А. // *Молекул. биология*. 1969. Т. 3. С. 210–219.
36. Зарытова В.Ф., Пичко Н.П. // *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук*. 1990. Вып. 3. С. 3–10.
37. Wafa O.A., Lentz A., Goubeau J. // *Z. Anorg. Allg. Chem*. 1970. V. 378. P. 273–282.
38. Райт В.К., Халимская Л.М., Ямковой В.И. Методики выделения ферментов. Методические указания к большому биохимическому практикуму. Новосибирск: НГУ, 1986. С. 19–23.
39. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
40. Mirakami A., Blake K.R., Miller P.S. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 4041–4046.
41. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Халимская Л.М. // *Биоорган. химия*. 1986. Т. 12. С. 475–481.

## Reactive Derivatives of Phosphorothioate Oligonucleotide Analogues. III. Synthesis of 3'- and 5'-Phosphoramidate Alkylating Derivatives of Phosphorothioate Oligonucleotide Analogues Containing an Aromatic Residue of Nitrogen Lost

N. V. Amirkhanov<sup>#</sup>, N. V. Neronova\*, Yu. Ya. Markushin\*,  
V. I. Yamkovo<sup>\*\*</sup>, and V. F. Zarytova\*

\*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,  
Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>\*\*</sup>Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

Phosphorothioate oligonucleotide analogues (PTOA) containing a free 3'- or 5'-terminal phosphate group were synthesized and transformed into PTOA reactive derivatives carrying an alkylating residue of *N*-methyl-4-(*N*-methyl-*N*'-2-chloroethylamino)benzylamine (HN(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>RCI) attached to this group. As exemplified by RCI-derivatives of tetra-, octa-, and dodecadeoxyribo-PTOA, the alkylating group retains its reactivity toward nucleophiles in the course of the synthesis and isolation of such reagents. For the resulting 5'-RCI-derivatives of PTOA, the rate constant of the C–Cl bond ionization, the limiting stage in the interaction with nucleophiles, was evaluated ( $k_0 (3.12 \pm 0.32) \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ ).

*Key words:* oligonucleotide, phosphorothioate analogues, phosphotriester synthesis, alkylating derivatives

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed.