



УДК 547.963.32.057:542.95

## СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПО КОНЦЕВОЙ ТИОФОСФАТНОЙ ГРУППЕ

© 1999 г. В. Г. Метелев<sup>#</sup>, Т. С. ОрецкаяМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,  
119899, Москва, В-234, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 04.09.98 г. Принята к печати 16.11.98 г.

Предложен эффективный способ получения производных олигонуклеотидов по концевым тиофосфатным группам с помощью бифункциональных реагентов: синтезированы конъюгаты олигодезоксирибонуклеотидов с *D*-глюкозамином, *N*<sup>α</sup>-ацетиллизинном и дипептидами Gly-Gly и Ala-Val. Все стадии синтеза (алкилирование, ацилирование) проходят с высокими выходами.

*Ключевые слова:* олигонуклеотид-3'-тиофосфаты; олигонуклеотид-пептидные конъюгаты; бифункциональные реагенты.

Конъюгаты синтетических олигодезоксирибонуклеотидов с различными лигандами находят широкое применение в молекулярной биологии и антисенс-технологии. Для получения таких соединений чаще всего проводится постсинтетическая модификация специально введенных в процессе синтеза 3'- или 5'-концевых фосфатных групп. В нашей лаборатории разработаны и успешно используются методы присоединения нуклеофильных реагентов к концевым фосфатам олигонуклеотидов с помощью водорастворимых карбодиимидов и бромциана [1, 2]. Широко известны также способы синтеза конъюгатов с помощью активации концевых фосфатных и тиофосфатных групп смесью трифенилфосфина, дипиридилдисульфида и диметиламинопиридина [3–6]. С помощью этих методов синтезированы, например, конъюгаты олигонуклеотидов с дауномицином [7, 8], пептидами [9], *D*- и *L*-аминокислотами, циклосерином, *D*-глюкозамином [5], дистамицином, нетропсином [6] и многими другими биологически значимыми соединениями. Для практического применения таких производных олигонуклеотидов важно совершенствование методов их получения (удешевление синтеза, минимизация числа стадий, упрощение условий проведения реакций).

Наше внимание привлекло свойство атома серы в тиофосфатах легко подвергаться алкилированию бром- или йодсодержащими соединениями в мягких условиях [10–14]. В большинстве опи-

санных в литературе синтезов производных олигонуклеотидов используется предварительная конденсация концевых фосфатов или аминоклифосфамидов олигонуклеотидов с цистамином и другими соединениями, содержащими меркаптогруппу с последующей ее модификацией. В предлагаемой работе исследована возможность алкилирования непосредственно концевых 3'-тиофосфатов олигонуклеотидов бифункциональными соединениями общей формулы Hal-X-Z, где Hal – бром или йод, X – часть молекулы, представляющая собой углеводородный радикал для галоидкарбоновых кислот или остаток амидов уксусной кислоты в случае более сложных бифункциональных агентов, Z – карбокси- или сложноэфирная группы (активированный эфир). Такой бифункциональный реагент должен мягко и избирательно алкилировать олигонуклеотид-3'-тиофосфат по атому серы, а группа Z должна быть инертна по отношению к олигонуклеотиду и может быть использована в дальнейшем для ковалентного связывания с нуклеофильными реагентами.

Для синтеза были выбраны модельный олигонуклеотид – (5')TTGCGTAGps (где ps означает тиофосфат –OP(O)O-S-) и олигонуклеотид (5')TGCCGCAGCCACGps, комплементарный области 1540–1552 из ask-asd – оперона *Micobacterium smegmatis*. Наш выбор объясняется тем, что было показано [5] эффективное ингибирование роста бактерий *M. smegmatis* антисмысловыми олигодезоксирибонуклеозидтиофосфатами и их производными, комплементарными области 1526–1552. Для получения олигонуклеотидов с 3'-концевой тиофосфатной группой первый нуклеозид-3'-амидофосфита присоединяли к β-сульфоэтильной якорной группе и полученный фосфит окисляли 3*N*-1,2-бенздитиол-3-он-1,1-диоксидом. Синтези-

Сокращения: SIAB – *N*-оксисукцинимидный эфир 4-йодацетамидобензойной кислоты.

Префикс "d" (дезоксид) при обозначении олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

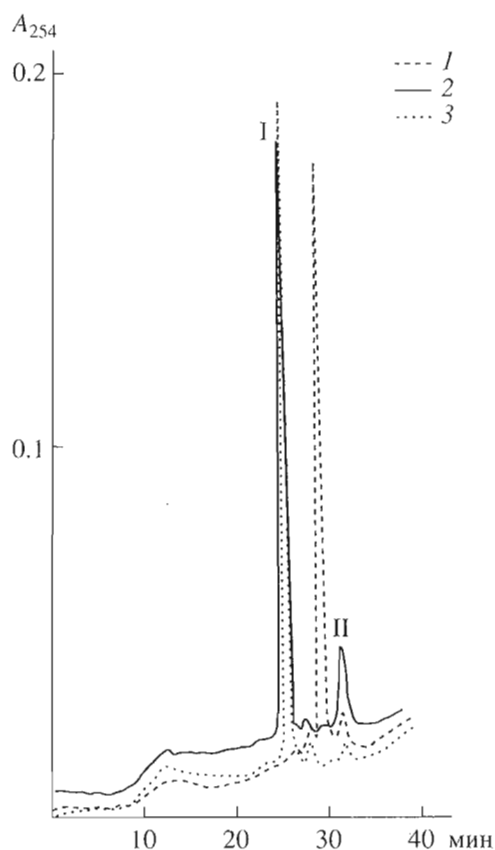
<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 939-54-07; факс: 939-31-58; e-mail: metelev@biorg.chem.msu.su).

рованные олигонуклеотиды обычно были гомогенными по данным ВЭЖХ. В качестве примесей иногда присутствовали получающиеся при окислении целевых соединений атмосферным кислородом [15] S-S-димеры (5–8%) (5')TTGCGTAG-OP(O)(O<sup>-</sup>)SSP(O)(O<sup>-</sup>)O-GATGCGTT(5') и (5')TGCCGCAGCCACG-OP(O)(O<sup>-</sup>)SSP(O)(O<sup>-</sup>)O-GCACCGACGCCGT(5'). Последние легко восстанавливаются до исходных соединений при обработке дитиотреитом [15].

В качестве простейших бифункциональных реагентов первоначально мы выбрали бром- и йодуксусную кислоты.

Контроль за протеканием реакции галогенпроизводных с олигонуклеотид-3'-тиофосфатами или контрольными олигонуклеотид-3'-фосфатами осуществляли с помощью ВЭЖХ на PEI-носителе в ионообменном [16] или в ион-парном режиме [17]. Эксперименты показали, что в буферном растворе при pH 7.5 олигонуклеотиды TTGCGTAGps и TGCCGCAGCCACGps за 5 ч практически количественно (см. рис. 1) алкилировались бромуксусной и свежерастворенной йодуксусной кислотами с образованием TTGCGTAG-OP(O)(O<sup>-</sup>)SCH<sub>2</sub>COOH и TGCCGCAGCCACG-OP(O)(O<sup>-</sup>)SCH<sub>2</sub>COOH. (При использовании растворов йодуксусной кислоты 2–3-дневной давности становится заметным образование S-S-димеров олигонуклеотидов, вероятно, из-за присутствия в смеси йода [18].) В случае использования бромуксусной кислоты образования S-S-димеров олигонуклеотидов не наблюдается. Синтезированные продукты устойчивы при хранении при –10–15°C не менее двух месяцев. В тех же условиях контрольные сернесодержащие олигонуклеотиды TTGCGTAGp и TGCCGCAGCCACGp не подвергаются заметной модификации в течение 16 ч. В данных условиях для олигонуклеотида, содержащего межнуклеотидную тиофосфатную группу, (TGCCGCAGCCACpsG, ps означает -OP(O)S-O-) продукты модификации также обнаружены не были.

Полученные карбоксиалкильные производные олигодезоксирибонуклеотидов могут служить хорошими исходными для синтеза различных конъюгатов при активации свободной карбоксильной группы. Однако для упрощения процедуры и сокращения стадий синтеза в ряде случаев, по-видимому, удобно использовать не галогенкарбоновую кислоту, а непосредственно активированный эфир такой кислоты. Из имеющихся в нашем распоряжении бифункциональных сшивающих реагентов мы выбрали *N*-оксисукцинимидный эфир 4-йодацетамидобензойной кислоты (SIAB). В качестве нуклеофильных реагентов для последующего присоединения по карбоксильной группе были использованы: *D*-глюкозамин (показано, что введение его в антисмысловые олигонуклеотиды способствовало повышению биологической ак-

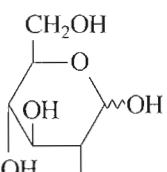
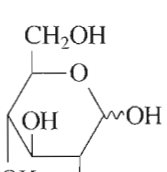


**Рис. 1.** Хроматографический анализ в условиях I (см. “Эксперимент. часть”) реакционной смеси после обработки олигонуклеотида TGCCGCAGCCACGps (1) йодуксусной кислотой (2) и бромуксусной кислотой (3). Пик I соответствует целевому продукту TGCCGCAGCCACG-OP(O)(O<sup>-</sup>)SCH<sub>2</sub>COOH, пик II соответствует димеру (5')TGCCGCAGCCACG-OP(O)(O<sup>-</sup>)SSP(O)(O<sup>-</sup>)-GCACCGACGCCGT(5').

тивности полученных конъюгатов [5]); дипептиды Gly-Gly и Aa-Val, как модели для присоединения пептидов через  $\alpha$ -аминогруппу, и  $N^{\alpha}$ -ацетиллизин — как модель конъюгации через  $\epsilon$ -аминогруппу.

При инкубации олигонуклеотид-3'-фосфата с SIAB и одним из перечисленных нуклеофильных реагентов наблюдалось образование целевого соединения. В случае *D*-глюкозамина и  $N^{\alpha}$ -ацетиллизина реакция шла эффективно (см. таблицу, соединения (II), (III), (VI), (VII)). В случае дипептидов выходы были ниже, особенно для Ala-Val. Это связано с тем, что из-за плохой растворимости SIAB в воде реакция проводилась в 50% DMF, а в этих условиях не удается создать необходимую концентрацию дипептидов. Поэтому для повышения выхода конъюгатов олигодезоксирибонуклеотид-3'-фосфатов с дипептидами мы использовали другой прием: сначала получали производное олигонуклеотида с SIAB, затем к нему добавляли 0.2–0.3 М растворы дипептидов. В результате целевые конъюгаты были получены с

## Выходы и масс-спектральные характеристики производных олигонуклеотидов

Номер	Производное олигонуклеотида*	Выход, %	Метод**	Масс-спектральные характеристики***
(I)	$\text{R}^1-\text{O}-\text{P}\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S}-\text{X}-\text{NHCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CO}_2\text{H} \\ \text{OH} \end{array}\right)$	90	Б	4310 (4308)
(II)	$\text{R}^1-\text{O}-\text{P}\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S}-\text{X}-\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CHNHCOCCH}_3 \\ \text{OH} \qquad \qquad \qquad \text{CO}_2\text{H} \end{array}\right)$	93	А	4363 (4364)
(III)	 $\text{R}^1-\text{O}-\text{P}\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S}-\text{X}-\text{NH} \\ \text{OH} \end{array}\right)$	95	А	4357 (4358)
(IV)	$\text{R}^1-\text{O}-\text{P}\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S}-\text{X}-\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CONHCH}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{H} \\ \text{OH} \qquad \qquad \qquad \text{CH}_3 \qquad \qquad \qquad \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{array}\right)$	85	Б	—
(V)	$\text{R}^2-\text{O}-\text{P}\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S}-\text{X}-\text{NHCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CO}_2\text{H} \\ \text{OH} \end{array}\right)$	90	Б	—
(VI)	$\text{R}^2-\text{O}-\text{P}\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S}-\text{X}-\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CHNHCOCCH}_3 \\ \text{OH} \qquad \qquad \qquad \text{CO}_2\text{H} \end{array}\right)$	95	А	—
(VII)	 $\text{R}^2-\text{O}-\text{P}\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S}-\text{X}-\text{NH} \\ \text{OH} \end{array}\right)$	95	А	—
(VIII)	$\text{R}^2-\text{O}-\text{P}\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S}-\text{X}-\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CONHCH}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{H} \\ \text{OH} \qquad \qquad \qquad \text{CH}_3 \qquad \qquad \qquad \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{array}\right)$	85	Б	—

\* X = CH<sub>2</sub>CONHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO, R<sup>1</sup> = TGCCGCAGCCACG, R<sup>2</sup> = TTGCGTAG.

\*\* Методы А и Б см. "Эксперимент. часть".

\*\*\* В скобках приведены рассчитанные значения.

хорошими выходами (выше 80%, см. таблицу, соединения (I), (IV), (V), (VIII)). Строение синтезированных конъюгатов подтверждено избирательным расщеплением P-S-связей ионами серебра [19], в результате которого образовывались соответствующие олигодезоксирибонуклеотид-3'-фо-

сфаты (см. рис. 2), а также данными масс-спектрометрии (таблица).

Таким образом, нами предложен эффективный способ получения производных олигонуклеотидов с помощью бифункциональных реагентов по специально введенным 3'-концевым тиофос-

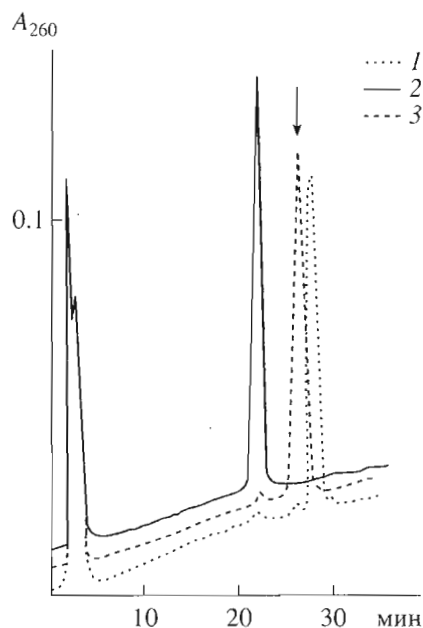
фатным группам. Преимущество данного метода заключается в том, что все стадии получения целевого продукта (алкилирование, ацилирование) проходят с высокими выходами, а также отсутствует обработка конденсирующими реагентами, такими как водорастворимые карбодимиды, и не требуется перевод олигонуклеотидов в цетавлоновые соли и проведение реакций в органических растворителях [1–6]. Полученные конъюгаты устойчивы при хранении. В дальнейшем мы предполагаем подробнее изучить их гидролитическую устойчивость и отработать условия препаративного синтеза таких соединений.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 5'-*O*-диметокситритил-3'-(*N,N*-диизопропиламидо)-β-цианэтилфосфиты 2'-дезоксирибонуклеозидов (Applied Biosystems, США); *N*-метилимидазол, трихлоруксусную кислоту (Fluka, Швейцария); тетразол (Pharmacia, ФРГ); *D*-глюкозамин, бромуксусную и йодуксусную кислоты (Aldrich, США); *N*-оксисукцинимидный эфир 4-йодацетамидобензойной кислоты (Pierce, США); 3*H*-1,2-бенздитиол-3-он-1,1-диоксид (Glen Research, США); дипептиды Gly-Gly и Ala-Val (Reanal, Венгрия); *N*<sup>α</sup>-ацетиллизин (ICN Biochemicals, США); дитиотреит (Serva, ФРГ); дигидрофосфат калия и гидроксид калия марки ос.ч. (КНПО "Диагностикум", Россия), ацетонитрил марки "для жидкостной хроматографии" (Merck, Германия).

Автоматический твердофазный синтез олигодезоксирибонуклеотидов осуществлен амидофосфитным методом на ген-синтезаторе Applied Biosystems 380В (США) с использованием коммерческих реагентов и растворителей по стандартному регламенту. Для введения в олигонуклеотиды концевого 3'-тиофосфата использовали коммерческий реагент 5'-фосфат ON (Cruachem, США) или полимерный носитель, содержащий β-сульфоэтильную якорную группу [20]. После присоединения первого нуклеозид-3'-амидофосфита проводили окисление полученного фосфита 1% раствором 3*H*-1,2-бенздитиол-3-он-1,1-диоксида в ацетонитриле в течение 10 мин при комнатной температуре. После чего синтез продолжали в стандартном автоматическом режиме. Удаление щелочеллабильных защитных групп проводили при 55°C в течение 6 ч в присутствии 10 мМ дитиотреита. Очистку олигодезоксирибонуклеотид-3'-тиофосфатов осуществляли с помощью ВЭЖХ в обращенно-фазовом варианте, используя гидрофобные свойства диметокситритильной группы.

Анализ реакционных смесей проводили с помощью ВЭЖХ в ионообменном или в ион-парном режимах на хроматографе Altex и Waters (США) в условиях: I – колонка SCOUT WP PEI (5 мкм, 4,6 × 50 мм, J.T. Barker, США) [16], комнатная температура, градиент концентрации фосфата калия



**Рис. 2.** Хроматографический анализ в условиях I (см. "Эксперимент. часть") олигонуклеотида TGCCGCAGCCACGp (1), конъюгата TGCCGCAGCCACG-OP(O)(O<sup>-</sup>)SCH<sub>2</sub>CONHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH(CO<sub>2</sub>H)NHCOCH<sub>3</sub> (2), продукта расщепления последнего соединения нитратом серебра (3). Стрелкой отмечено место выхода в тех же условиях олигонуклеотида TGCCGCAGCCACGp.

(0.005 → 0.5 М за 60 мин) в 25% ацетонитриле, pH 7.0, скорость элюции 0.5 мл в мин; II – колонка 4 × 250 мм, сорбент Диасорб С<sub>16</sub>Т (размер частиц 7 мкм), температура колонки 45°C, элюент – 48 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.0), содержащий 2 мМ тетрабутиламмонийдигидрофосфат с логарифмическим градиентом концентрации ацетонитрила 5 → 40% [17], расход элюента 1 мл в мин.

Масс-спектры регистрировали на приборе VISION 2000.

Для предотвращения образования S-S-димеров олигонуклеотид-3'-тиофосфатов в опытах использовали кипяченую в течение 30 мин воду, охлажденную с пробулькиванием азота. Перед проведением реакций алкилирования олигонуклеотиды проверяли на наличие в них возможных примесных S-S-димеров и если содержание последних было заметным, то проводили дополнительную обработку олигонуклеотидного материала: к 15 нмоль олигонуклеотида в 100 мкл воды добавляли 25 мкл 100 мкМ DTT, 25 мкл 0.05 М Трис-НCl pH 7.5, раствор выдерживали при комнатной температуре 40–50 мин, после чего добавляли 600 мкл 2% раствора перхлората лития в ацетоне и олигонуклеотидный материал осаждали центрифугированием.

**Обработка олигодезоксирибонуклеотид-3'-тиофосфатов бром- и йодуксусными кислотами.** К 1–15 нмоль олигонуклеотид-3'-тиофосфата добавляли 100 мкл 25 мМ йод- или бромуксусной кислот в 0.1 М Трис-НCl pH 7.5 и раствор инкуби-

ровали 5 ч при комнатной температуре. После чего добавляли 10 мкл 3 М ацетата натрия и олигонуклеотидный материал высаживали спиртом.

**Синтез конъюгатов с использованием SIAB.**  
**Метод А:** раствор, содержащий 1.5–4 нмоль олигонуклеотид-3'-тиофосфата, 0.125 М D-глюкозамин или N<sup>α</sup>-ацетиллизин, 0.02 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50% DMF и 0.01 М SIAB инкубировали 15 ч при комнатной температуре, затем высаживали нуклеотидный материал спиртом. **Метод Б:** раствор, содержащий 1.5–4 нмоль олигонуклеотид-3'-тиофосфата, 50% DMF и 0.01 М SIAB, инкубировали при комнатной температуре 3 ч, добавляли 5-кратный объем 2% раствора перхлората лития в ацетоне, центрифугировали. К высушенному осадку добавляли 50 мкл 0.2–0.3 М раствора дипептида в 0.02 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и раствор выдерживали при комнатной температуре 15–18 ч. После чего добавляли 5 мкл 3 М ацетата натрия и олигонуклеотидный материал высаживали спиртом.

Избирательное расщепление P-S-связи проводили как описано в [19]. К 1 нмоль синтезированного конъюгата в 200 мкл воды добавляли 22 мкл 0.2 М нитрата серебра и смесь выдерживали 1 ч при 30°C, затем добавляли 132 мкл 0.1 М ДТТ. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, а супернатант анализировали в условиях I.

Авторы выражают благодарность В.Н. Ташлицкому за помощь при проведении анализа модифицированных олигонуклеотид-3'-тиофосфатов методом ион-парной ВЭЖХ.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-50397) и программы "Университеты России – фундаментальные исследования" (грант № 5-5166).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shabarova Z.A. // Biochimie. 1988. V. 70. P. 1323–1334.

2. Ivanovskaya M.G., Gottikh M.B., Shabarova Z.A. // Nucleosides Nucleotides. 1987. V. 6. P. 913–934.  
 3. Кнорре Д.Г., Зарытова В.Ф., Бадаишкеева А.Г., Федорова О.С. // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. 1991. Т. 37. С. 9–56.  
 4. Amirkhanov N.V., Zarytova V.F. // Nucleosides Nucleotides. 1995. V. 14. P. 935–937.  
 5. Rapaport E., Levina A., Metelev V., Zamecnik P.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 709–713.  
 6. Levina A.S., Metelev V.G., Cohen A.S., Zamecnik P.C. // Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1996. V. 6. P. 75–85.  
 7. Готтих М.Б., Ивановская М.Г., Скрипкин Е.А., Шабарова З.А. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 514–523.  
 8. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Лохов С.Г., Мальцева Т.В., Сергеев Д.С. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 1369–1378.  
 9. Пышный Д.В., Репкова М.Н., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Веняминова А.Г., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 497–504.  
 10. Thoung N.T., Chassignol M. // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. P. 4157–4160.  
 11. Gryaznov S.M., Schultz R., Chaturvedi S.K., Letsinger R.L. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 2366–2369.  
 12. Zhu T., Peng Y., Lackland H., Stein S. // Anal. Biochemistry. 1993. V. 214. P. 585–587.  
 13. Fidanza J., Ozaki H., McLaughlin L.W. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 5509–5514.  
 14. Player M.R., Xiao W., Cramer H., Torrence P.F. // Bioconjugate Chem. 1998. V. 9. P. 137–142.  
 15. Herrlein M.K., Letsinger R.L. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 5076–5078.  
 16. Метелев В.Г., Ташлицкий В.Н., Агравал С. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 742–746.  
 17. Ташлицкий В.Н., Орецкая Т.С. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 732–741.  
 18. Gryaznov S.M., Letsinger R.L. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 1403–1408.  
 19. Vyle J.S., Connolly B.A., Kemp D., Cosstick R. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 3012–3018.  
 20. Волков Е.М., Романова Е.А., Круг А., Орецкая Т.С., Потанов В.К., Шабарова З.А. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 1034–1039.

## Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides Modified at the Terminal Phosphorothioate Group

V. G. Metelev<sup>#</sup> and T. S. Oretskaya

Moscow State University, Chemical Faculty, Vorob'evy gory, GSP-3 Moscow, 119899 Russia

An effective method for the preparation of oligonucleotides modified at the terminal phosphorothioate groups with bifunctional reagents was suggested. Oligodeoxyribonucleotide conjugates with D-glucosamine, N<sup>α</sup>-acetyllysine, and dipeptides Gly-Gly and Ala-Val were synthesized in high yields.

*Key words:* bifunctional reagents, oligonucleotide-peptide conjugates, oligonucleotide 3'-phosphorothioates

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 939-5407; phone +7 (095) 939-3158; e-mail: metelev@biorg.chem.msu.su.