



УДК 577.113.4+547.435+547.546

## СИНТЕЗ И СВОЙСТВА БЛОКИРОВАННЫХ ФОТОЛАБИЛЬНЫМИ ГРУППАМИ ФОСФОТРИЭФИРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДИНУКЛЕОЗИДФОСФАТОВ

© 2000 г. Т. В. Абрамова<sup>#</sup>, Ж. П. Леонетти\*, В. В. Власов, Б. Леблэ\*

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

\* Институт молекулярной генетики, Университет Монпелье, Монпелье, Франция

Поступила в редакцию 25.05.99 г. Принята к печати 08.09.99 г.

Синтезированы динуклеозидфосфаты с фосфатными группами, временно блокированными *o*-нитробензильными и *o*-нитровератрильными остатками. Показано, что условия деблокирования фосфатных групп при облучении ультрафиолетовым светом существенно зависят от природы защитной группы. Полученные фосфотриэфиры устойчивы к действию фосфодиэстеразы змеиного яда и нуклеаз клеточного экстракта. Синтез блокированных фотолабильными группами динуклеозидфосфатов – подготовительный этап перед включением модифицированных блоков в протяженные олигонуклеотиды с использованием фосфамидитного метода.

*Ключевые слова:* производные олигонуклеотидов; фотолабильные соединения.

Для развития ряда направлений молекулярной биологии, таких, как изучение взаимодействия нуклеиновых кислот с белками в клеточных компартментах и создание ген-направленных биологически активных веществ на основе олигонуклеотидов, необходимы производные олигонуклеотидов, способные проникать в эукариотические клетки. Один из подходов к получению таких производных – блокирование фосфатов различными группами с целью устранения отрицательных зарядов сахарофосфатного остова, препятствующих проникновению олигонуклеотидов сквозь липидные мембраны. Описано большое количество электронейтральных аналогов олигонуклеотидов [1]. Однако такие аналоги существенно отличаются от природных олигонуклеотидов по своим свойствам и не могут полностью их имитировать, в том числе и при взаимодействии с белками.

Недавно описаны оригинальные группы для модификации фосфодиэфирных межнуклеотидных связей, удаляющиеся в биологически активной среде в результате действия клеточных карбоксиэстераз [2]. “Про-олигонуклеотиды” с такими группами были сконструированы для того, чтобы обеспечить защиту фосфодиэфирных связей вне клетки, облегчить транспорт олигонуклеотидов через мембрану и обеспечить превращение транспортной формы олигонуклеотидов в природ-

ные соединения при их поступлении в цитоплазму. Преимущество данного подхода по сравнению с другими известными модификациями сахарофосфатного остова состоит в том, что он не ведет к необратимым изменениям олигонуклеотидов, исключая, таким образом, проблемы изменения их гибридизационных свойств, уменьшения селективности взаимодействия с нуклеиновыми кислотами, ослабления способности их гибридных комплексов взаимодействовать с РНКазой H.

В данной работе мы предлагаем метод такого обратимого блокирования фосфодиэфирных связей олигонуклеотидов фотолабильными группами.

Временно блокированные (в англоязычной литературе принят термин “caged”) фотолабиль-

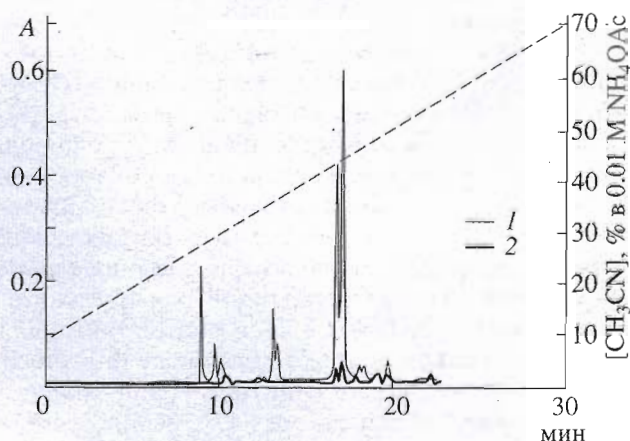


Рис. 1. Профиль хроматографического разделения реакционной смеси после синтеза соединения (1a). Детекция на длине волны 260 (1) и 320 нм (2). Условия хроматографии см. “Эксперимент. часть”.

Сокращения: DMTr – диметокситритил; Lev – левулинил; TPS – триизопропилбензолсульфонил; PhCl – *n*-хлорфенил; TBAF – тетрабутиламмонийфторид; Melm – *N*-метylimидазол; Trt – 1,2,4-триазол; ОФХ – обращенно-фазовая хроматография. Префикс “d” в названиях дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (3832) 33-32-71; e-mail: abramova@niboch.nsc.ru).

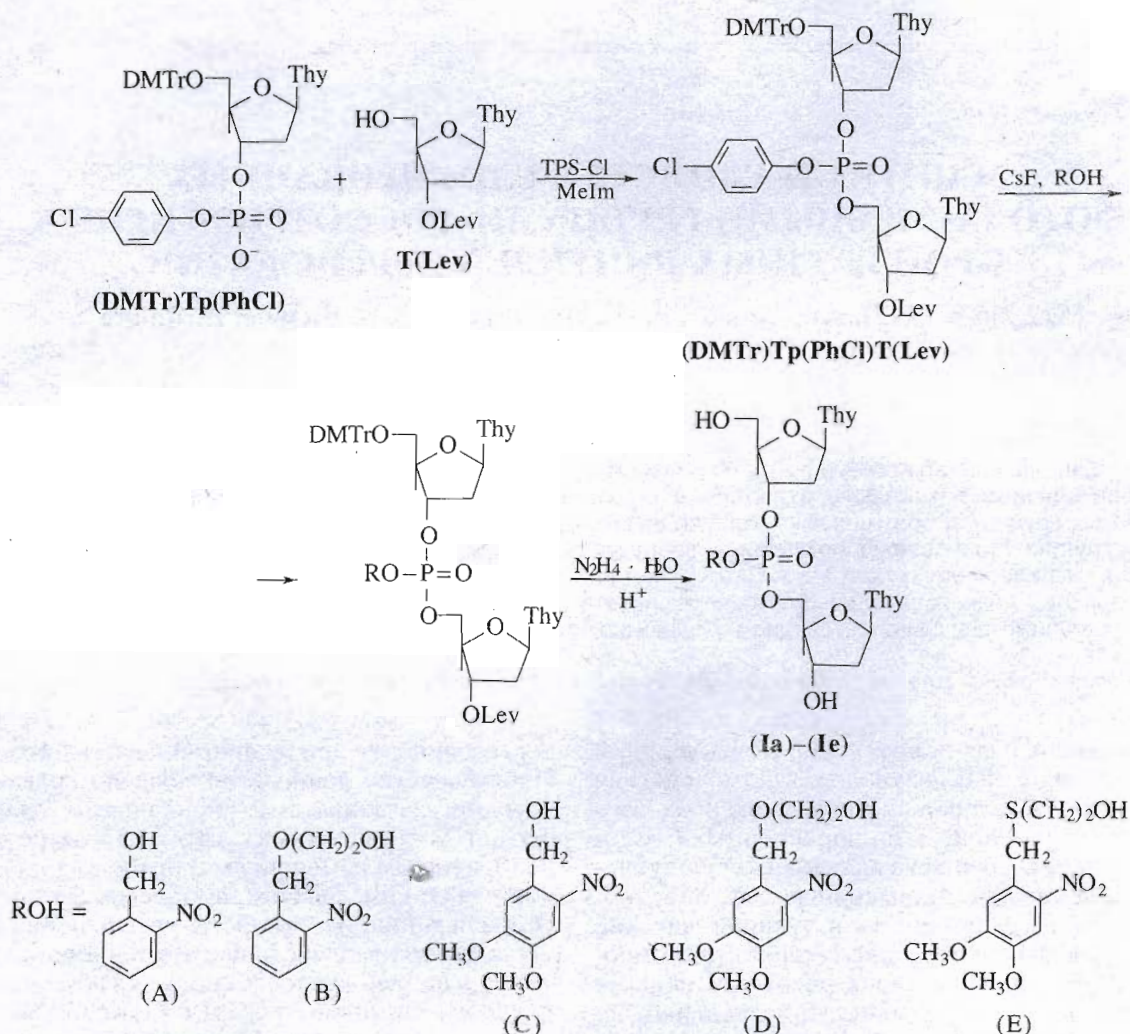


Схема 1.

ные соединения были предложены ранее [3] как неактивные производные, активная форма которых может быть генерирована в течение милли или микросекунд при УФ-облучении с помощью лазеров. Эти соединения нашли широкое применение в клеточной биологии при изучении молекулярной динамики. Описаны разные типы блокированных производных нуклеотидов, флуорофоров, нейропереносчиков или белков (см. обзор [3]). Однако синтез олигонуклеотидов с фотолабильной защитой по фосфату не был осуществлен. Создание таких производных было бы полезным при изучении белково-нуклеиновых и других взаимодействий с участием ДНК и РНК, а также для создания новых видов антисмысловых олигонуклеотидов. В отличие от защитных групп, удаляющихся в присутствии эстераз [2], используемые нами блокирующие группы можно удалять независимо от внутриклеточного ферментного окружения, причем начало деблокирования может контролироваться путем включения облучения.

Первый шаг к получению блокированных олигонуклеотидов – синтез различных производных динуклеозидфосфата ТрТ, несущих в качестве фотолабильной блокирующей группы *o*-нитробензильный или *o*-нитровератрильный остаток, этерифицирующие межнуклеотидные фосфатные группы.

Блокированные аналоги ТрТ (соединения **(Ia)**–**(Ie)**) (схема 1) были получены с помощью переэтерификации синтезированного нами защищенного по 3'- и 5'-гидроксигруппам *o*-хлорфенилового фосфотриэфира (DMTr)Tp(PhCl)T(Lev) в присутствии соответствующего спирта (A)–(E) и фторида цезия аналогично [4] с выходом от 50 до 80% в зависимости от спирта. 5'-Защитную группу удаляли кислотной обработкой, 3'-защитную группу – обработкой гидразингидратом в нейтральных условиях. При очистке продуктов **(Ia)**–**(Ie)** с помощью обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) для каждого из триэфиров наблюдалось появление двух пиков продукта, соответствующих двум диастереомерам по атому фосфора (см., например, рис. 1). В дальнейшей работе использовали

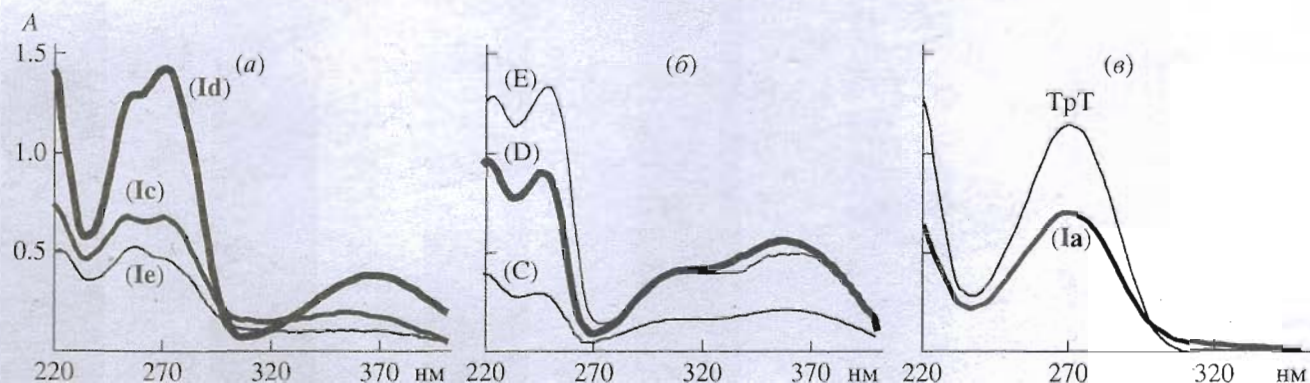


Рис. 2. Спектры электронного поглощения соединений (Ic), (Id), (Ie) (а); соединений (C), (D), (E) (б); соединений (Ia) и TrT (в). Все спектры записаны в ходе хроматографии с помощью детектора с фотодиодной матрицей хроматографической системы Beckman Gold.

смесь диастереомеров без разделения. Было получено от 25 до 40 ОЕ<sub>260</sub> каждого продукта из 5 мг полностью защищенных производных, за исключением производного (Ie), которое оказалось нестабильным при удалении диметокситритильной защитной группы в кислых условиях и получено с выходом, в 5 раз меньшим.

В УФ-спектрах соединений (Ic), (Id) и (Ie), записанных в ходе обращенно-фазовой хроматографии, присутствуют полосы поглощения в диапазоне 300–390 нм, которые являются характерными для *o*-нитровератрильного остатка (ср. рис. 2а и 2б). УФ-спектр *o*-нитробензильного аналога (Ia) близок к спектру TrT (рис. 2в).

Стабильность полученных соединений (Ia)–(Ie) в стандартных условиях удаления защитных групп водным аммиаком оказалась достаточно высокой. Период полураспада с образованием TrT для соединения (Ia) при выдерживании в концентрированном водном аммиаке при комнатной температуре составляет около 18 ч, для соединения (Ic) – 6 ч. Соединения (Ib) и (Id) стабильны в водном аммиаке (около 10% распада за 18 ч), для соединения (Ie)  $\tau_{1/2}$  – 15 ч.

Фоточувствительность заблокированных фосфотриэфирных аналогов проверяли при облучении их водных растворов УФ-светом с длиной волны 254 и 365 нм. Дитимидилфосфат TrT при облучении в этих условиях, по данным ОФХ, не подвергался никаким изменениям. При анализе производного (Ia), облученного УФ-светом с длиной волны 254 нм, наблюдалось появление пика, соответствующего TrT, с периодом полупревращения около 10 мин (таблица). При облучении УФ-светом с длиной волны 365 нм, который оказывает меньшее повреждающее влияние на биологические объекты, соединение (Ia) деблокируется значительно медленнее ( $\tau_{1/2}$  около 6 ч), что объясняется меньшим коэффициентом молярного поглощения ( $\epsilon_{350}$  500 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>,  $\epsilon_{260}$  4700 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [5]) и меньшим квантовым выходом реакции при облучении на этой длине волны [3]. Фоточувствитель-

ность соединения (Ia) оказалась значительно меньше, чем можно было предположить, исходя из данных по фотолизу модельного соединения (II) (*o*-нитробензильный эфир тимидин-5'-фосфата, схема 2), содержащего такую же фотолабильную защитную группу, время деблокирования которого в наших условиях составило около 3 мин при  $\lambda_{254}$  и 60 мин при  $\lambda_{365}$  (таблица). Возможно, наличие заряженного остатка фосфорной кислоты в соединении (II) способствует отщеплению протона, необходимому, согласно установленному механизму фотолиза для подобных соединений [5], на первой стадии фотолиза. Данные по скорости фотодоблокирования для соединения (II) согласуются с данными работы [6] для 5'-[1-(*o*-нитрофенил)-2-амино]этилового эфира динуклеотида рTrT.

Нитровератрильное производное (Ic) (коэффициент молярного поглощения  $\epsilon_{360}$  5000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [5]) деблокировалось приблизительно в 3 раза быстрее, чем нитробензильное производное (Ia) (таблица) при облучении на длине волны 365 нм, однако значительно медленнее при облучении на длине волны 254 нм. Введение дополнительного оксиэтильного линкера между фотореакционным центром и межнуклеотидной фосфатной группой приводит к увеличению скорости фотолиза в 5–10 раз (см. данные для производных (Ia)

Время полупревращения ( $\tau_{1/2}$ , мин) фотолабильных производных при облучении УФ-светом

Соединение*	$\lambda$ облучения, нм	
	254	365
(Ia)	10.2	360
(Ib)	1.8	35
(Ic)	60	120
(Id)	–	23
(Ie)	–	9
(II)	3	60

\* См. схемы 1, 2.

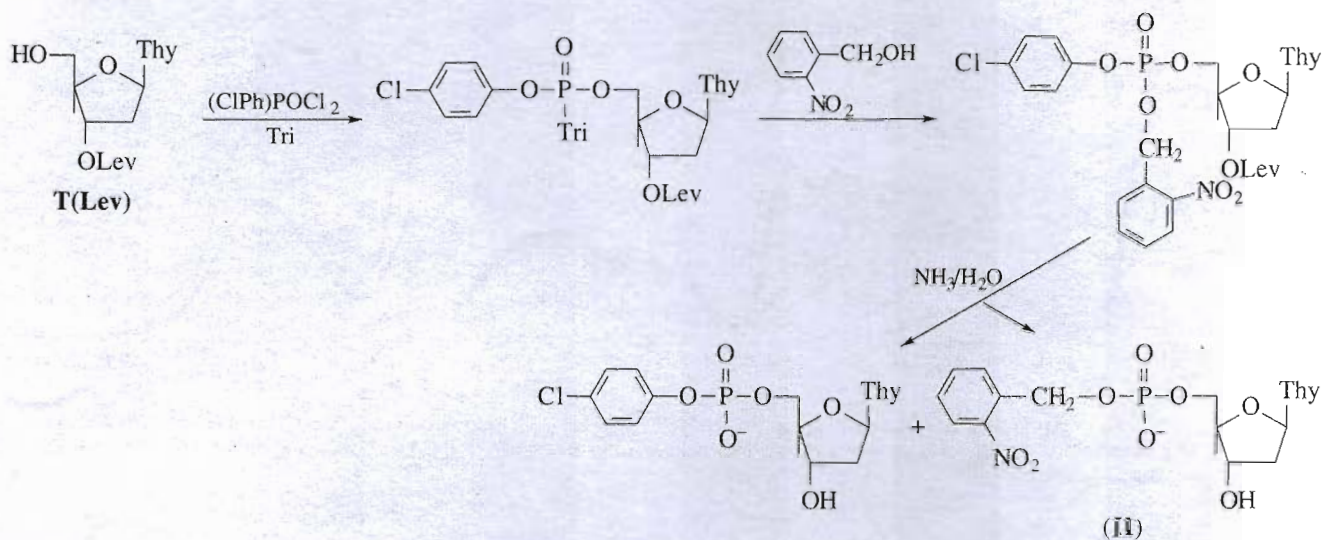


Схема 2.

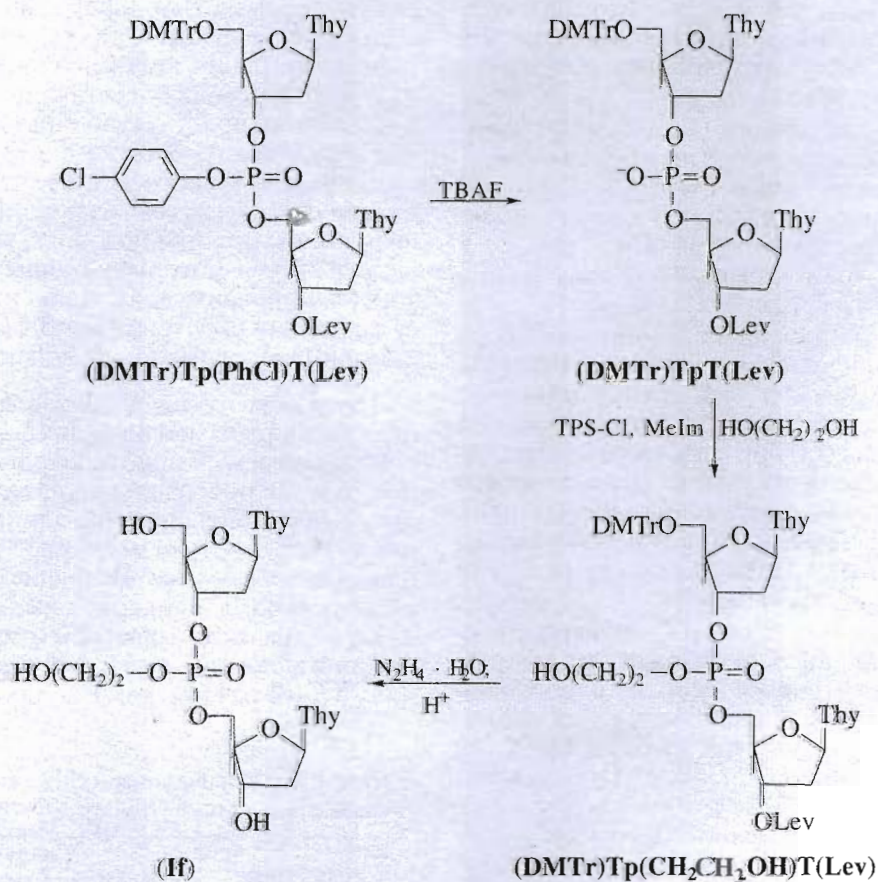


Схема 3.

и **(Ib)**, **(Ic)** и **(Id)** в таблице), что, вероятно, объясняется природой расщепляемой связи (фосфоэфирная или алкилэфирная группировки). При фотолитическом расщеплении соединений **(Ib)** и **(Id)** образуется сравнительно стабильное промежуточное производное,

которое при анализе методом ОФХ совпадает с этиленгликолем фосфотриэфирным производным **ТрТ (If)**, синтезированным встречным синтезом (схема 3). При инкубации реакционных смесей после облучения соединений **(Ib)** и **(Id)** в темноте в

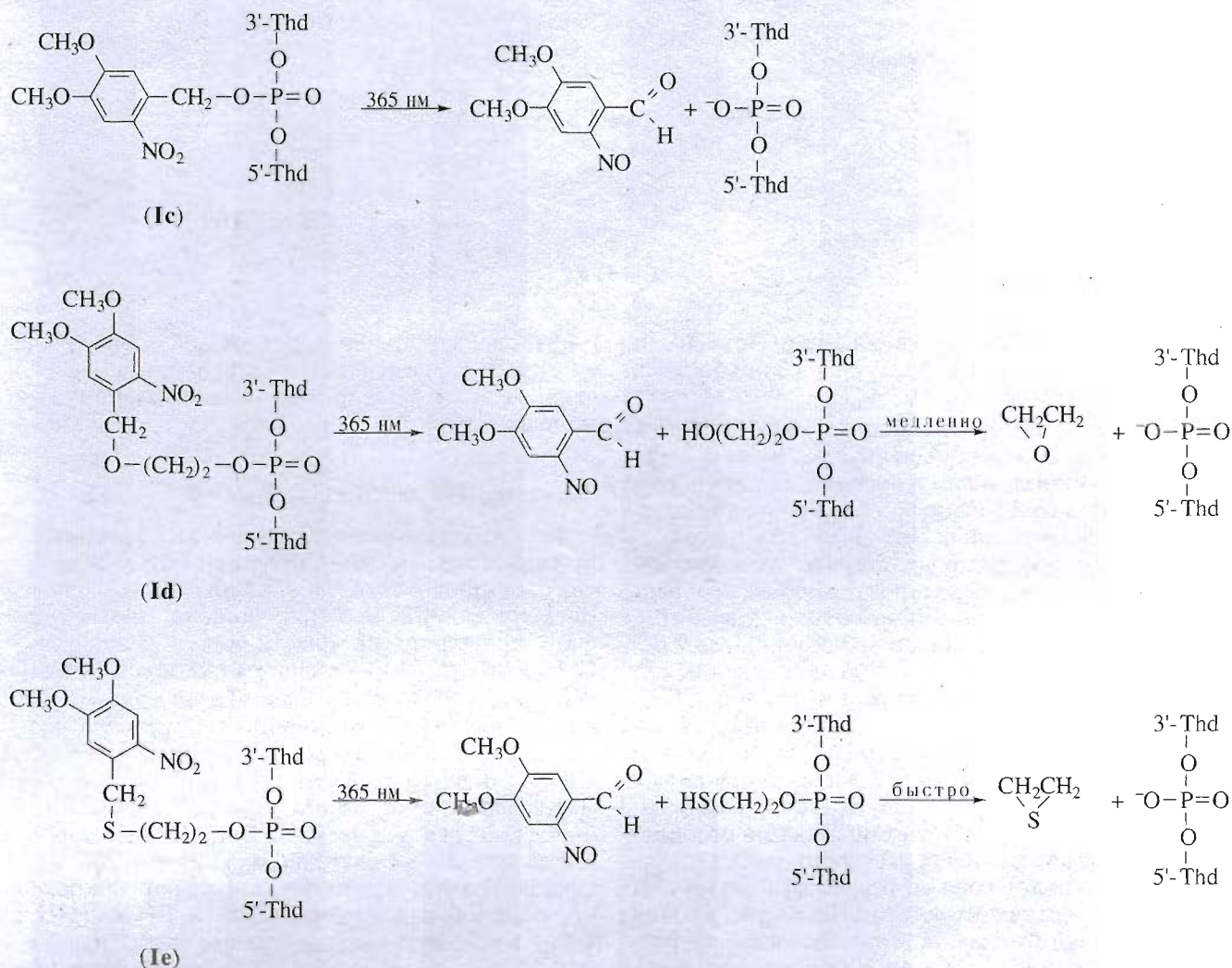


Схема 4.

течение нескольких часов содержание промежуточного продукта фотолиза (**If**) уменьшается и накапливается продукт, соответствующий, по данным ОФХ, ТрТ с периодом полупревращения около 6 ч. Накопление ТрТ происходит быстрее при 37°C или в щелочных условиях. При выдерживании в концентрированном водном аммиаке соединение (**If**) полностью разлагается в течение 1 ч.

С целью получения при фотолизе менее стабильного, чем в случае триэфиров (**Ib**), (**Id**), соединения и ускорения образования ТрТ был получен триэфир (**Ie**), содержащий меркаптоэтильный линкер вместо оксиэтильного. Более нуклеофильная тиольная группа, образующаяся при фотолизе производного (**Ie**), способствовала быстрой элиминации линкера, так что наличие промежуточного соединения в этом случае нами зарегистрировано не было, и скорость исчезновения исходного соединения совпадала со скоростью образования ТрТ (9 мин). Замещение эфирной группировки между этиленовым линкером и фотолабильной группой на тиоэфирную несколько

ко ускорило фотолиз. К сожалению, производное (**Ie**) оказалось малоустойчивым в кислых и даже нейтральных условиях, что, очевидно, будет препятствовать синтезу соответствующих производных олигонуклеотидов. Возможная последова-

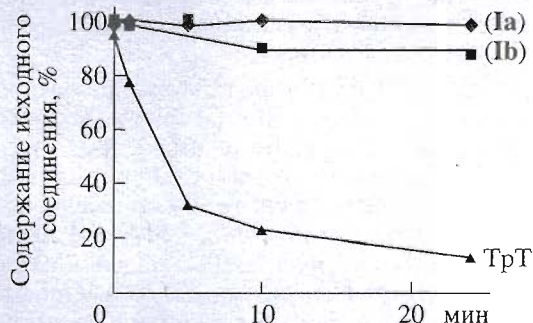


Рис. 3. Устойчивость соединений ТрТ, (**Ia**) и (**Ib**) в клеточном экстракте HeLa. Условия эксперимента см. "Эксперимент. часть".

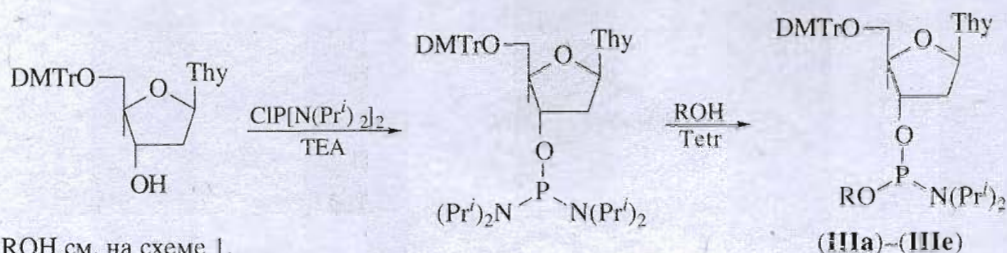


Схема 5.

тельность превращений соединений (**Ic**), (**Id**) и (**Ie**) при облучении и последующей инкубации в темноте приведена на схеме 4 [7].

Недостаточная стабильность по отношению к нуклеазам природных олигонуклеотидов – одна из главных проблем при их использовании в биологических исследованиях. Мы сравнили стабильность производных (**Ia**)–(**Ie**) и ТрТ в присутствии очищенной фосфодиэстеразы змеиного яда (ФДЭ) и в клеточном экстракте. Все исследованные фосфотриэфирные производные, кроме (**Ie**), оказались устойчивыми по отношению к ФДЭ змеиного яда, хотя при инкубации соединений (**Ib**) и (**Id**) в течение нескольких часов при 37°C в присутствии 0.5 ед. акт./мл ФДЭ наблюдается появление небольших количеств ТрТ (до 10%). Производное (**Ie**) разлагается ФДЭ в этих условиях с периодом полупревращения около 4 ч, однако это соединение, как уже упоминалось, нестабильно в нейтральных водных растворах даже в отсутствие фермента. Сходные результаты получены в опытах с экстрактом клеток HeLa (рис. 3). Под действием клеточных эстераз динуклеозидфосфат ТрТ гидролизует в течение 1 ч в этих условиях, в то время как фосфотриэфирные производные (**Ia**) и (**Ib**) сохраняются интактными.

Соединения (**Ia**)–(**Id**) сравнительно устойчивы при стандартных условиях удаления защитных групп в олигонуклеотидном синтезе. Это делает возможным синтез производных протяженных олигонуклеотидов стандартным фосфамидитным методом с использованием коммерчески доступных нуклеозидфосфамидитов с лабильными защитными группами по основаниям, удаляющимся при мягкой аммиачной обработке или в нейтральных условиях.

Для проверки этого предположения нами получены соответствующие фосфамидитные производные тимидина (**IIIa**)–(**IIIe**) (схема 5) как описано в работе [8]. С использованием стандартного протокола фосфамидитного синтеза на синтезаторе Cyclone Plus (MilliGene/Biosearch, США) синтезированы димеры (**Ia**)–(**Ie**), идентичные по данным ОФХ и УФ-спектроскопии соединениям, полученным с помощью реакции переэтерификации в растворе.

Таким образом, нами получены динуклеозидфосфаты с фосфатными группами, блокированными фотолabileными *o*-нитробензильными и

*o*-нитровератрильными остатками, подтверждена структура полученных соединений и исследованы их некоторые физико-химические и биохимические свойства.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все использованные химические реагенты – производства Aldrich (США) или Fluka (Швейцария), фосфодиэстераза змеиного яда – фирмы Boehringer (ФРГ). Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках с силикагелем 60 F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ) в системе хлористый метилен–метанол, 9 : 1, если не указано другое. Для колоночной хроматографии использовали силикагель Porasil Silica 125A (55–105 мкм) (Waters, США). Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили с помощью хроматографической системы Beckman Gold (США), включающей детектор с фотодиодной матрицей, с программой интегрирования площадей пиков, на обращенной фазе Lichrosorb RP 18, 10 мкм (Merck, ФРГ) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.01 М ацетате аммония (10–70% за 30 мин). Спектры ЯМР записывали на спектрометре AC-250 (Brucker, ФРГ) в CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD или (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, химические сдвиги выражали в миллионных долях (шкала δ), используя в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР в качестве внутреннего стандарта тетраметилсилан, в спектрах <sup>31</sup>P-ЯМР в качестве внешнего стандарта – 85% фосфорную кислоту в D<sub>2</sub>O. Масс-спектры записывали на спектрометре Jeol DX 300 (Франция) с помощью метода бомбардировки ускоренными атомами (FAB > 0 или < 0), используя в качестве матрицы смесь глицерина и тиоглицерина (GT), нитробензиловый спирт (NBA) или полиэтиленгликоль (PEG).

(DMTr)Тр(PhCl)Т(Lev) (схема 1). а) 3'-*O*-Левулинилтимидин [Т(Lev)]. Левулиновую кислоту (0.255 г, 2.2 ммоль) растворили в 10 мл абсолютного эфира и добавили 0.225 г (1.1 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Реакционную смесь перемешивали 3 ч при комнатной температуре, отфильтровали, фильтрат упарили, остаток растворили в 2 мл безводного пиридина. В раствор добавили 0.3 г (0.55 ммоль) 5'-*O*-диметокситриптилтимидина и 0.077 мл (1.1 ммоль) *N*-метилимидазола. Через 30 мин реакцию остановили добав-

лением нескольких капель 5% водного раствора  $\text{NaHCO}_3$ , реакционную смесь упарили, остаток растворили в 25 мл хлористого метилена, раствор промыли 25 мл 5% водного раствора  $\text{NaHCO}_3$  и водой ( $2 \times 25$  мл). Органический слой высушили безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упарили несколько раз с толуолом для удаления следов пиридина. Для удаления диметокситритильной защитной группы с полученного 5'-*O*-диметокситритил-3'-*O*-левулинимида [(DMTr)T(Lev)] остаток растворили в 80% водной уксусной кислоте (10 мл) и выдержали 2 ч при 40°C. Реакционную смесь упарили несколько раз с толуолом, остаток растворили в хлористом метилена, продукт 3'-*O*-левулинимида [T(Lev)] выделили с помощью колоночной хроматографии, элюируя линейным градиентом концентрации метанола в хлористом метилена (0–10%). Продукт получен в виде стекловидного остатка. Выход 0.22 г (0.4 ммоль, 73%).  $R_f$  0.34.

б) 5'-*O*-Диметокситритилтимидин-3'-хлорфенилфосфат [(DMTr)Tp(ClPh)]. 5'-*O*-Диметокситритилтимидин (0.3 г, 0.55 ммоль) фосфорилировали с помощью *n*-хлорфенилфосфодихлорида в присутствии 1,2,4-триазола в пиридине аналогично [9]. После стандартной обработки реакционной смеси (см. выше) и осаждения продукта из хлористого метилена десятикратным объемом петролейного эфира получено 0.36 г (DMTr)Tp(PhCl) (0.43 ммоль, 78%).

в) Соединения (DMTr)Tp(PhCl) (0.43 ммоль) и T(Lev) (0.4 ммоль) конденсировали в присутствии триизопропилбензолсульфохлорида (1.2 ммоль) и *N*-метилимидазола (3.6 ммоль) в безводном пиридине согласно [10]. После стандартной обработки реакционной смеси (см. выше), хроматографии на силикагеле (линейный градиент (0–10%) метанола в хлористом метилена, содержащем 0.1% пиридина) и осаждения продукта петролейным эфиром из хлористого метилена получено 0.3 г соединения (DMTr)Tp(PhCl)T(Lev) (0.3 ммоль, 75%).  $R_f$  0.42.

**о-Нитровератрилэтиленгликоль (соединение (D)).** *o*-Нитровератрилобромид (0.27 г, 1 ммоль) растворили в 5.5 мл этиленгликоля (100 ммоль) и выдержали 20 мин при 100°C. После стандартной обработки реакционной смеси (см. выше), хроматографии на силикагеле (линейный градиент метанола (0–10%) в хлористом метилена) и двукратной перекристаллизации из метанола получено 0.125 г продукта (0.5 ммоль, выход 50%).  $R_f$  0.04 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).  $^1\text{H-NMP}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.51 (с, 1H, H3(Ar)); 7.22 (с, 1H, H6(Ar)); 4.90 (с, 2H,  $>\text{CH}_2\text{-O-}$ ); 3.96, 3.88 (2с, 6H, 2(-OCH<sub>3</sub>)); 3.81 (м, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); 3.68 (м, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH). MS (FAB > 0, NBA) ( $M + \text{H}$ )<sup>+</sup> 258. Соединение (B) синтезировали аналогично из *o*-нитробензилбромида с выходом 60%.

**2-(*o*-Нитровератрил)меркаптоэтанол (соединение (E))** синтезировали аналогично описанному в работе [11]. 2-Меркаптоэтанол (70 мкл, 1 ммоль) растворили в 0.4 мл этанола, добавили 0.11 мл 10 н.

$\text{NaOH}$  и 0.14 мл воды. К этому раствору добавили 0.24 г (0.87 ммоль) *o*-нитровератрилобромида порциями в течение 20 мин при перемешивании. Через 30 мин осадок отфильтровали, промыли этанолом, фильтрат упарили. Остаток растворили в 20 мл хлористого метилена, раствор промыли 5% водным  $\text{NaOH}$  ( $3 \times 20$  мл) и водой ( $3 \times 20$  мл). Органический слой высушили безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили. Остаток перекристаллизовали из диэтилового эфира. Выход 0.15 г (0.55 ммоль, 60%).  $R_f$  0.04 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).  $^1\text{H-NMP}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.57 (с, 1H, H3(Ar)); 6.83 (с, 1H, H6(Ar)); 4.08 (с, 2H,  $>\text{CH}_2\text{-S-}$ ); 3.92, 3.89 (2с, 6H, 2(-OCH<sub>3</sub>)); 3.70 (м, 2H, -S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); 2.68 (т, 2H, -S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH); 2.02 (т, 1H, -OH). MS (FAB > 0, NBA) ( $M + \text{H}$ )<sup>+</sup> 273.

**Переэтерификация (DMTr)Tp(PhCl)T(Lev) (схема 1, аналогично методу, описанному в работе [4]).** (DMTr)Tp(PhCl)T(Lev) (20 мг), соответствующий спирт ((A), (B), (C), (D) или (E)) (20 мг) и прокаленный CsF (20 мг) растворили в 0.2 мл безводного ацетонитрила и выдержали 20 мин при 50°C при интенсивном перемешивании. Реакционную смесь упарили, остаток растворили в хлористом метилена, отфильтровали, фильтрат упарили. Продукты переэтерификации (Ia)–(Id) выделили с помощью хроматографии на силикагеле в линейном градиенте концентрации метанола в хлористом метилена (0–10%) в присутствии 0.1% пиридина. Выход 50–80%.  $R_f$  0.29–0.31 для различных производных ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -этилацетат- $\text{CH}_3\text{OH}$ , 2.5 : 7.5 : 1).

**(DMTr)Tp(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)T(Lev) (схема 3).** К соединению (DMTr)Tp(PhCl)T(Lev) (0.12 г, 0.12 ммоль) добавили 2 мл 0.33 М раствора тетрабутиламмонийфторида в смеси пиридин–вода (1 : 1, pH 7.0) и выдержали 5 ч при 50°C. Реакционную смесь упарили и подвергли стандартной обработке (см. синтез соединения T(Lev)). Продукт осадил из хлористого метилена петролейным эфиром. Получено 0.11 г (0.11 ммоль, выход 85%) (DMTr)TpT(Lev). 20 мг (0.02 ммоль) этого соединения растворили в абсолютном пиридине (1 мл), добавили к раствору этиленгликоль (0.1 мл, 1.8 ммоль), триизопропилбензолсульфонилхлорид (0.2 г, 0.6 ммоль) и *N*-метилимидазол (0.11 мл, 1.5 ммоль). После завершения реакции (30 мин) реакционную смесь подвергли стандартной обработке, продукт выделили с помощью хроматографии на силикагеле в линейном градиенте концентрации метанола в хлористом метилена (0–15%) в присутствии 0.1% пиридина. Выход 70%.  $R_f$  0.14.

**Удаление диметокситритильной и левулинильной защитных групп с триэфирных производных (получение производных (Ia)–(If), схемы 1 и 3).** Полностью защищенное соединение (DMTr)Tp(R)T(Lev) (5 мг) обрабатывали гидразингидратом в нейтральных условиях для удаления левулинильной защитной группы согласно работе [12]. Продукт выделяли с помощью хроматографии на силикагеле (линейный градиент

(0–10%) метанола в хлористом метиле, содержащем 0.1% пиридина). Затем проводили удаление диметокситритильной защитной группы обработкой 80% водной уксусной кислотой в течение 30 мин в случае фотолабильных фосфотриэфирных производных. В случае этиленгликолевого фосфотриэфира проводили кратковременную (1 мин) обработку 2% раствором дихлоруксусной кислоты в хлористом метиле. Кислоту нейтрализовали добавлением концентрированного водного аммиака при 0°C. После упаривания реакционной смеси остаток растворили в 10% водном ацетонитриле и выделили соединения (Ia)–(If) с помощью обращенно-фазовой хроматографии в градиенте концентрации ацетонитрила (10–70%) за 30 мин в 0.01 М ацетате аммония (колонка 1 × 25 см, скорость элюции 2 мл/мин). Детекцию вели на двух длинах волн – 260 и 320 нм. Во всех случаях, за исключением соединения (If), наблюдалось два пика продукта (см., например, рис. 1), соответствующих двум диастереомерам по атому фосфора. После лиофилизации соответствующих фракций получено 25–40 ОЕ<sub>260</sub> продуктов (Ia), (Ib), (Ic), (Id) и (If). Продукта (Ie) получено 5 ОЕ<sub>260</sub>, так как это соединение неустойчиво в кислой и нейтральной средах. Для соединения (Ia) (смесь диастереомеров): <sup>31</sup>P-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD): 1.99. <sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD): 8.18–8.10 (м, 1H, H<sub>3</sub>(Ar)); 7.80–7.75 (м, 3H, H<sub>6</sub>, H<sub>5</sub>(Ar), H<sub>6</sub>(pT)); 7.65–7.54 (м, 1H, H<sub>4</sub>(Ar)); 7.50–7.46 (2д, 1H, H<sub>6</sub>(Tp)); 6.33–6.22 (м, 2H, 2H<sup>1'</sup>); 5.58, 5.54 (2с, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 5.13 (м, 1H, H<sub>3</sub>(Tp)); 4.47–4.32 (м, 3H, H<sup>5'a</sup>, H<sup>5'b</sup>, H<sup>3'</sup>(pT)); 4.23–4.12 (2м, 1H, H<sup>4'</sup>(Tp)); 4.08–4.01 (м, 1H, H<sup>4'</sup>(pT)); 3.39 (м, 2H, H<sup>5'a</sup>, H<sup>5'b</sup> (Tp)); 2.60–2.20 (3м, 4H, 2(H<sup>2'a</sup>, H<sup>2'b</sup>)); 1.98 (д, 3H, -CH<sub>3</sub>(pT)); 1.82 (2д, 3H, -CH<sub>3</sub>(Tp)).

**o-Нитробензиловый эфир тимидин-5'-фосфата (соединение II), схема 2).** 3'-Левулинил-тимидин (50 мг, 0.15 ммоль), *n*-хлорфенилфосфодихлорид (28 мкл, 0.17 ммоль) и 1,2,4-триазол (60 мг, 0.87 ммоль) растворили в 1 мл безводного пиридина. Через 30 мин в реакционную смесь добавили 220 мг (1.5 ммоль) *o*-нитробензилового спирта. Через 1 ч реакцию остановили добавлением нескольких капель 5% водного раствора NaHCO<sub>3</sub> и реакционную смесь упарили. Очистку продукта реакции (*R<sub>f</sub>* 0.35) проводили с помощью хроматографии на силикагеле как для T(Lev). Целевые фракции упарили, к остатку добавили 5 мл концентрированного водного аммиака и оставили на 2 сут при комнатной температуре. После упаривания реакционной смеси выделение продукта (II) проводили с помощью ОФХ как описано для соединений (Ia)–(If). Получено 120 ОЕ<sub>260</sub> соединения (II) и приблизительно такое же количество *n*-хлорфенилового эфира тимидин-5'-фосфата.

**Фосфамидитные синтоны (DMTr)Thd-OP(OR)[N(Pr')<sub>2</sub>] ((IIIa)–(IIIe), схема 5).** Синтез *N*-диизопропилфосфамидитных синтонов для ав-

томатического синтеза олигонуклеотидов, содержащих фотолабильную группу, осуществляли по общей схеме аналогично [8]. Для соединения (IIIa): (DMTr)Thd (0.272 г, 0.5 ммоль) растворили в 2.5 мл безводного диоксана, к раствору добавили 0.105 мл (0.75 ммоль) триэтиламина и 0.2 г (0.75 ммоль) (*bis*-диизопропиламино)хлорфосфина. Реакционную смесь перемешивали 30 мин, затем отфильтровали, фильтрат упарили. Остаток растворили в 2 мл безводного ацетонитрила и в раствор добавили 0.11 г (0.75 ммоль) *o*-нитробензилового спирта и 0.5 мл 0.45 М раствора тетразола в безводном ацетонитриле. Обе стадии реакции контролировали ТСХ, *R<sub>f</sub>* конечного продукта 0.64 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-этилацетат-триэтиламин, 9 : 10 : 1). После завершения реакции реакционную смесь разбавили 25 мл 10% триэтиламина в хлористом метиле и промыли 25 мл 5% водного NaHCO<sub>3</sub>. Органический слой высушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили. Сырой продукт очистили с помощью хроматографии на силикагеле в линейном градиенте концентрации метанола (0–5%) в смеси CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-этилацетат-триэтиламин, 9 : 10 : 1. Целевые фракции упарили, остаток растворили в хлористом метиле, продукт осадил десятикратным объемом петroleйного эфира при охлаждении смесью воды и льда. Получено 0.25 г соединения (IIIa) (0.3 ммоль, 60%, смесь диастереомеров). <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 149.85, 149.61; MS (FAB < 0, PEG) (*M* – 1)– 825, (FAB > 0, PEG) (*M* + 1)<sup>+</sup> 827.

Соединения (IIIb)–(IIIe) синтезировали аналогично. Выход от 50 до 70%. Для (IIIb): <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 149.01, 148.84; MS (FAB < 0, PEG) (*M* – 1)– 869, MS (FAB > 0, PEG) 871. Для (IIIc): <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 149.56, 149.25; MS (FAB < 0, PEG) *M*– 886. Для (IIId): <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 148.77, 148.25; MS (FAB < 0, PEG) *M*– 930. Для (IIIe): <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 148.96, 149.17; MS (FAB < 0, GT) (*M* – 1)– 945.

**Стабильность фосфотриэфирных производных (Ia)–(If). а) В концентрированном водном аммиаке.** К 10 мкл раствора 1 ОЕ<sub>260</sub> соединений (Ia)–(If) в метаноле добавили 0.5 мл 25% водного аммиака. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты по 0.1 мл и анализировали методом ОФХ в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (10–70% за 30 мин) в 0.01 М ацетате аммония. Колонка 0.4 × 20 см, скорость элюции 0.5 мл/мин. Детекцию вели на двух длинах волн – 260 и 320 нм. Стабильность соединений оценивали по соотношению площадей пиков исходного соединения и продукта гидролиза (TpT).

**б) В присутствии фосфодиэстеразы змеиного яда.** 1 ОЕ<sub>260</sub> фосфотриэфирных производных (Ia)–(If) инкубировали 4 ч при 37°C в 1 мл раствора, содержащего 10 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит и 0.5 ед.акт. фермента. Через определенные промежутки времени отби-



рали аликвоты по 0.1 мл и анализировали методом ОФХ как описано выше (см. подпункт а).

**в) В экстракте клеток HeLa (рис. 3).** Клетки HeLa росли на среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. Для приготовления экстракта клетки дважды промыли 10 мл охлажденного (4°C) фосфатно-солевого буфера и суспендировали в 1 мл того же буфера. После центрифугирования остаток ( $5 \times 10^6$  клеток) ресуспендировали в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит и гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса при 0°C. Гомогенат центрифугировали, супернатант разделяли на аликвоты по 20 мкл. Для определения стабильности производных (Ia)–(If) аликвоты экстракта клеток HeLa (20 мкл) добавляли к 80 мкл раствора, содержащего 10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 50 мМ NaCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит, 0.1 ОЕ<sub>260</sub> триэфирного производного динуклеозидфосфата, и инкубировали при 37°C. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты реакционной смеси по 20 мкл и анализировали методом ОФХ как описано выше (см. подпункт а).

**Фотолиз производных (Ia)–(Ie) (таблица).** К 10 мкл раствора 1 ОЕ<sub>260</sub> соединений (Ia)–(Ie) в метаноле добавили 1 мл 0.01 М калий-фосфатного буфера, рН 7.0. Аликвоты объемом 0.1 мл облучали при охлаждении смесью воды со льдом светом ртутной лампы высокого давления Phillips 125W (диапазон излучения 330–390 нм) или в ультрафиолетовом кросс-линкере (40W, диапазон излучения 254–365 нм) в течение определенных промежутков времени (от 0 до 35 мин) и немедленно анализировали методом ОФХ как описано выше. В случаях периодов полупревращения, значительно больших, чем 35 мин, для оценки  $\tau_{1/2}$

применяли метод линейной регрессии. Для соединений (Id) и (Ie), кроме того, проводили анализ после выдерживания облученных проб в темноте от 0 до 16 ч при комнатной температуре. Скорость фотолиза определяли по соотношению площадей пиков исходного соединения и продукта фотолиза ((If) в случае соединений (Id) и (Ie) или TrT для остальных соединений).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antisense Research and Applications / Eds S.T. Crook, B. Lebleu. Boca Raton; Ann Arbor; London; Tokyo: CRC Press, Inc., 1993. 579 p.
2. Barbier I., Rayner B., Imbach J.L. // Nucleosides Nucleotides. 1995. V. 14. P. 1083–1085.
3. Adams S.R., Tsien R.Y. // Annu. Rev. Physiol. 1993. V. 55. P. 755–784.
4. Петренко В.А., Поздняков П.И., Шубина Т.Н. // Биоорганическая химия. 1980. Т. 6. С. 431–435.
5. McCray J.A., Trentham D.R. // Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 1989. V. 18. P. 239–270.
6. Абрамова Т.В., Бугреев Д.В., Добриков М.И., Леонетти Ж.П., Лебле Б. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 195–202.
7. Eckstein F., Gish G. // Trends Biol. Sci. 1989. V. 14. P. 97–100.
8. Marugg J.E., Burik A., Tromp M., van der Marel G.A., van Boom J.H. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 2271–2274.
9. Stawinski J., Hozumi T., Narang S.A., Bahl C.A. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. P. 353–371.
10. Абрамова Т.В., Комарова Н.И., Мундус Д.А., Перебоева О.С. // Изв. Сиб. Отд. АН СССР. Сер. хим. наук. 1990. Вып. 5. С. 45–51.
11. Sinha N.D., Striepke S. // Oligonucleotides and Analogs. A Practical Approach / Ed. F. Eckstein. Oxford; New York; Tokyo: IRL Press at Oxford University Press, 1991. P. 185–210.
12. Van Boom J.M., Burger P.B.I. // Tetrahedron Lett. 1976. V. 52. P. 4875–4878.

## Synthesis and Properties of Photolabile (Caged) Phosphotriester Derivatives of Dinucleoside Phosphates

T. V. Abramova\*<sup>#</sup>, J. P. Leonetti\*\*, V. V. Vlassov\*, and B. Lebleu\*\*

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

\*\*Institute of Molecular Genetics, CNRS-Université de Montpellier, 1919, route de Mende, 34033 Montpellier, France

Dinucleoside phosphates that harbor phosphate groups transiently blocked (caged) by *o*-nitrobenzyl or *o*-nitroveratryl residues were synthesized. It was shown that the conditions of the UV-induced deprotection largely depend on the nature of the protective group. The phosphotriesters obtained were resistant toward snake venom phosphodiesterase and nucleases of the cellular extract. The synthesis of the dinucleoside phosphates containing a photolabile group preceded the incorporation of the modified blocks into extended oligonucleotides by the phosphoramidite method.

*Key words:* oligonucleotide derivatives, photolabile compounds

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; fax +7 (3832) 33-3271; e-mail: abramova@niboch.nsc.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 3. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.