



УДК 547.963.32:577.113.4

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ 2'-O-(2,3-ДИГИДРОКСИПРОПИЛ)УРИДИН И 2'-O-(2-ОКСОЭТИЛ)УРИДИН

© 2001 г. Т. С. Зацепиц, А. В. Качалова, Е. А. Романова,
Д. А. Стеценко*, М. Дж. Гейт*, Т. С. Орецкая#

Химический факультет и НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119899, Москва, В-234, Воробьевы горы, МГУ;

*Лаборатория молекулярной биологии, Медицинский исследовательский центр, Кембридж, Великобритания
Поступила в редакцию 05.07.2000 г. Принята к печати 12.07.2000 г.

Получено новое модифицированное производное уридина – 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридин – и 3'-амидофосфит на его основе для направленного введения в олигонуклеотидную цепь в процессе автоматического химического синтеза. Синтезированы олигонуклеотиды длиной от 10 до 15 нт с включениями 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридина; окислением этих олигомеров периодатом натрия получены олигонуклеотиды, содержащие остатки 2'-O-(2-оксоэтил)уридина. Наличие реакционноспособной альдегидной группировки в 2'-положении углеводного фрагмента было подтверждено взаимодействием с *n*-нитрофенилгидразином и метиловым эфиром метионина. Показано, что термическая стабильность ДНК-дуплексов, содержащих модифицированные звенья, практически не изменяется по сравнению с природными аналогами.

Ключевые слова: модифицированные олигодезоксирибонуклеотиды, 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридин, 2'-O-(2-оксоэтил)уридин.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время число методов введения электрофильных группировок, например альдегидной и карбоксильной, в состав олигонуклеотида весьма ограничено. Модифицированные таким образом олигомеры способны взаимодействовать с молекулами соединений, содержащих нуклеофильную функцию, то есть могут быть использованы для введения репортерных групп, получения конъюгатов с молекулами пептидов и ДНК и создания других гибридных молекул. Альдегидная группа обладает рядом достоинств: при проведении реакции с соединениями, содержащими аминофункцию, не требуется предварительной активации; кроме того, становится возможным обратимое присоединение нуклеофильных групп (получение оснований Шиффа, гидразонов и снamiнов).

На сегодняшний день для синтеза модифицированных олигонуклеотидов, содержащих альде-

гидную группу в углеводном фрагменте, в олигомерную цепь вводят соединение-предшественник, включающее *цис*-диольную группу, которую далее окисляют периодатом натрия. Так были синтезированы олигонуклеотиды, содержащие 2'-O-(β-D-рибофуранозил)нуклеозиды [1, 2], 2'-дезоксид-2'-(2,3-дигидроксипропил)уридин [3] и 1-β-D-галактопиранозилтимин [4]. Последующее селективное окисление модифицированных звеньев периодатом натрия приводило к получению целевых олигомеров, содержащих альдегидную [3] или диальдегидную [1, 2, 4] группировку. Такие олигонуклеотиды использовали для аффинной модификации белков [4, 5]. Однако в процессе реакции при образовании на промежуточных стадиях иминов протекает частичная дегградация олигонуклеотидной цепи и, как следствие, разрушение конъюгата [4]. В работе [3] показано, что из-за наличия C–C-связи в 2'-положении углеводного фрагмента 2'-дезоксид-2'-(2-оксоэтил)уридина изменяется конформация углеводного фрагмента, и, как следствие, нарушаются стэкинг-взаимодействия в дуэлексе.

Нами предложен метод получения двух типов модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих *цис*-диольную или альдегидную группы. Получение таких олигомеров сводится

Сокращения: DABCO – 1,4-диазабисцикло[2.2.2]октан; DMTr – 4,4'-диметокситритил; Mes-Cl – мезитиленсульфохлорид; TBAF – фторид тетрабутиламония; TIPDS-Cl₂ – 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисулfoxан; U^d – 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридин; U^c – 2'-O-(2-оксоэтил)уридин.

#Автор для переписки (тел.: (095) 939-31-48; факс: (095) 939-31-81; e-mail: oretskaya@bioorg.chem.msu.ru).

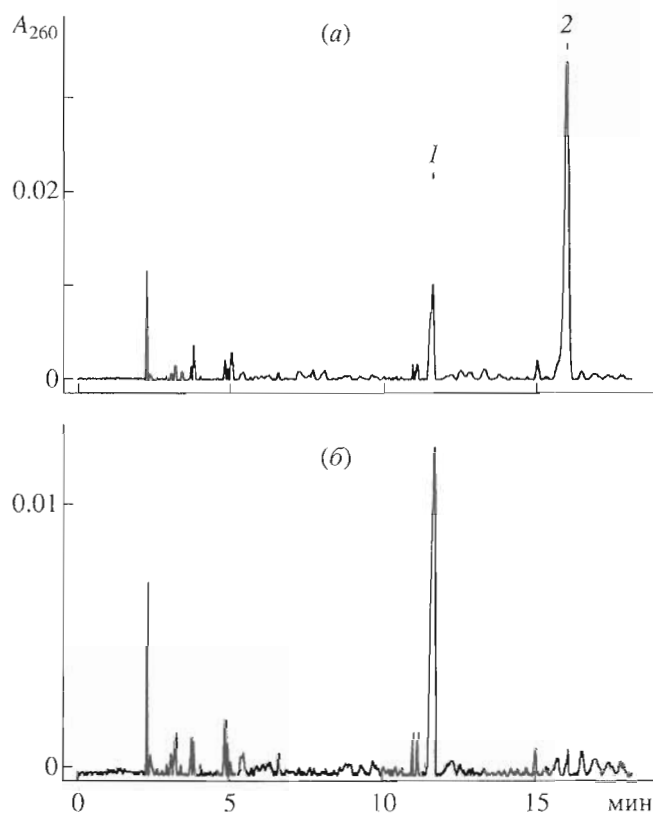


Рис. 1. Анализ реакционной смеси после реакции олигонуклеотида (VI) с *n*-нитрофенилгидразином методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте: (а) реакционная смесь, пик 1 – исходный олигонуклеотид (VI), пик 2 – продукт реакции олигонуклеотида (VI) с *n*-нитрофенилгидразином; (б) исходный олигонуклеотид (VI).

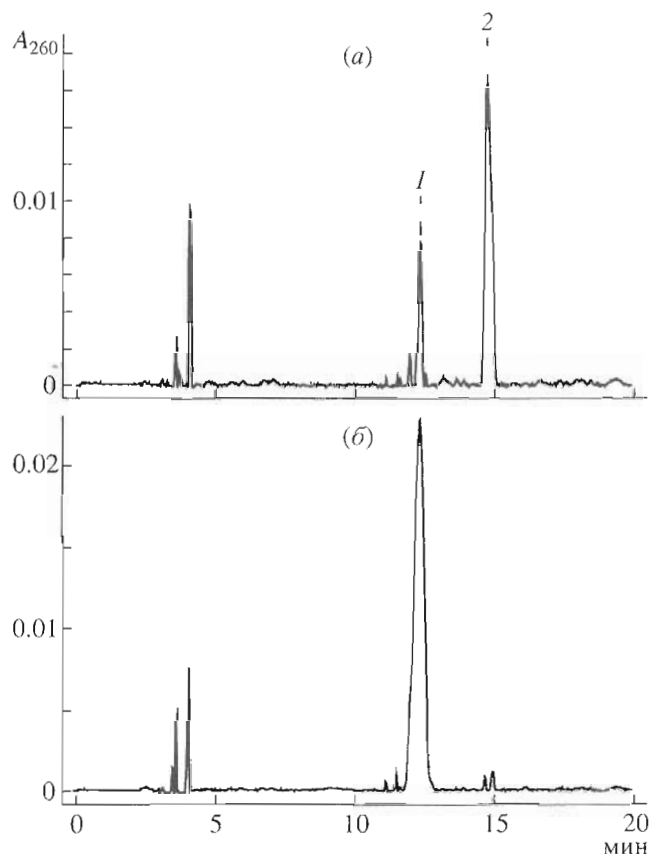


Рис. 2. Анализ реакционной смеси после реакции олигонуклеотида (VI) с метиловым эфиром метионина методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте: (а) реакционная смесь, пик 1 – исходный олигонуклеотид (VI), пик 2 – конъюгат олигонуклеотида (VI) с метиловым эфиром метионина; (б) исходный олигонуклеотид (VI).

прежде всего к синтезу модифицированного амидофосфитного производного, которое может быть встроено в любое положение олигомерной цепи с минимальными изменениями стандартной процедуры автоматического олигодезоксирибонуклеотидного синтеза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез 3'-(*N,N*-диизопропиламида)- β -цианэтилфосфита 2'-*O*-(2,3-дibenзоилоксипропил)-5'-*O*-диметокситритилуридина (схема 1) включает в себя ряд последовательных превращений: селективное силилирование 3'- и 5'-гидроксильных групп уридина (1) с использованием 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисилоксана (TIPDS-Cl₂, реагент Маркевича); блокирование *O*⁴-атома гетероцикла соединения (2) *o*-нитрофенолом. Введение аллильного заместителя в 2'-положение углеводного фрагмента нуклеозида (3) было осуществлено методом, предложенным Б. Шпротом и сотр. [6] с помощью аллилметилкарбоната в присутствии палладиевого катализатора. Удаление нитрофе-

нильной защиты гетероцикла соединения (4) осуществлялось *n*-нитробензальдоксимом. Окисление 2'-*O*-аллильного фрагмента в соединении (5) было проведено с помощью оксида осмия (VIII) в присутствии *N*-оксида *N*-метилморфолина. Нами были подобраны условия, при которых селективное окисление аллильного фрагмента протекает без образования продукта окисления по двойной связи C⁵=C⁶ урацила. Далее проводилось бензоилирование *цис*-диольной группы модифицированного нуклеозида (6) фенолглиоксилонитрилом, удаление защиты Маркевича соединения (7) фторидом тетрабутиламмония, селективное блокирование 5'-гидроксильной группы соединения (8) диметокситритильной защитной группой и получение 3'-амидофосфита (10).

Полученный синтон (10) вводился в автоматический амидофосфитный олигонуклеотидный синтез на синтезаторе Applied Biosystems 380В (США) с увеличением времени конденсации до 20 мин на стадии присоединения модифицированного звена к растущей олигомерной цепи. Степень превращения на этой стадии была несколько меньшей, чем при

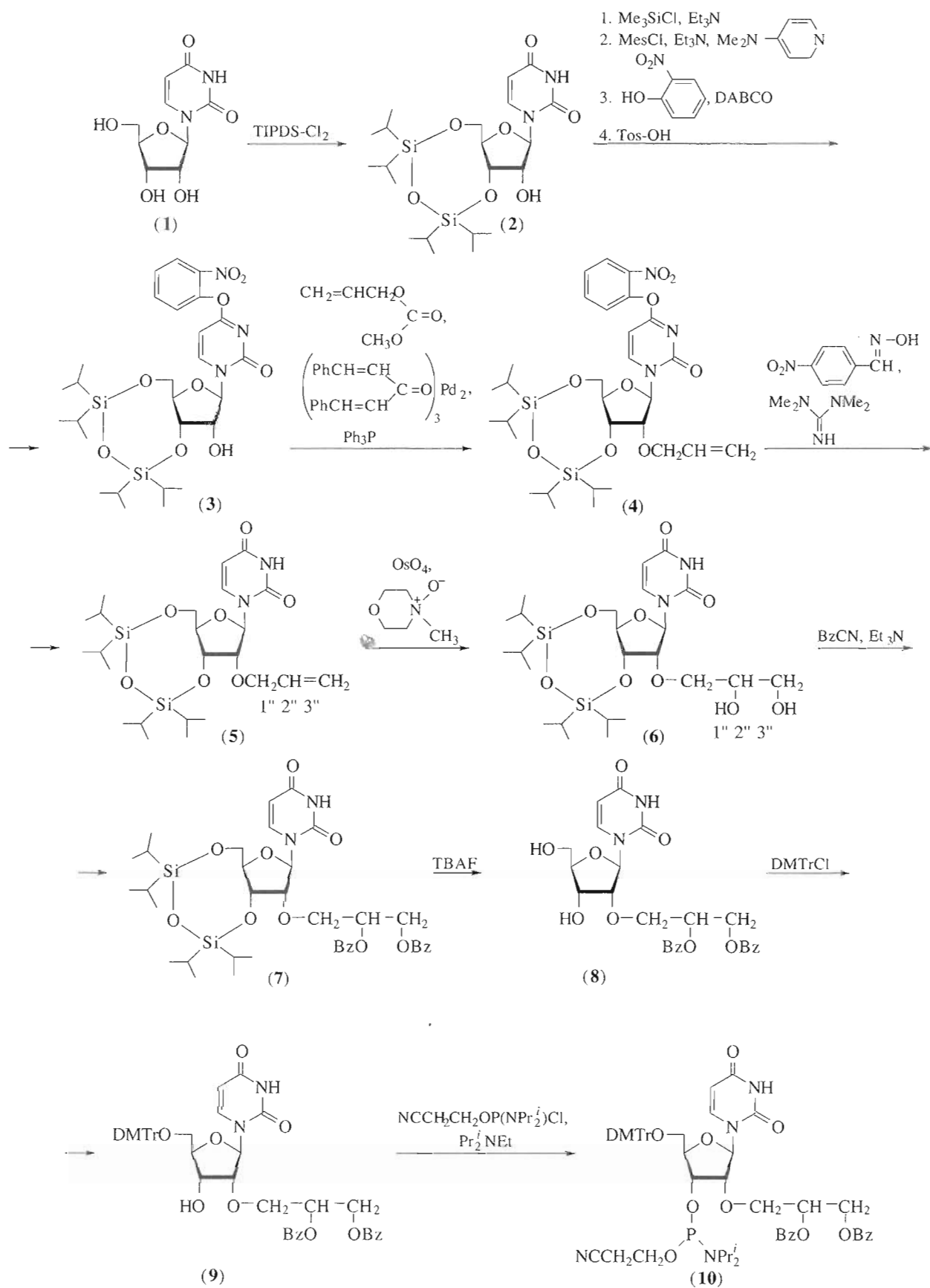
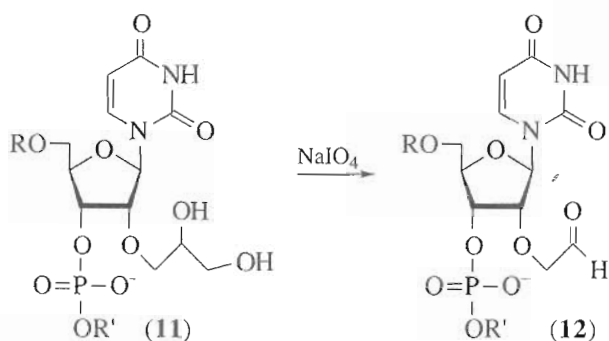


Схема 1.



R, R' – фрагменты олигодезоксирибонуклеотидной цепи.

Схема 2.

конденсации стандартных 3'-амидофосфитов 2'-дезоксирибонуклеозидов, и составляла около 95%. Это может быть связано со стерическими затруднениями, создаваемыми объемным заместителем в 2'-положении углеводного фрагмента. Защитные группы в модифицированных олигонуклеотидах удаляли по стандартной методике, и целевые продукты выделяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ методом, описанным в работе [7].

Были синтезированы следующие модифицированные олигодезоксирибонуклеотиды (I)–(V), содержащие 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридин (5' → 3'):



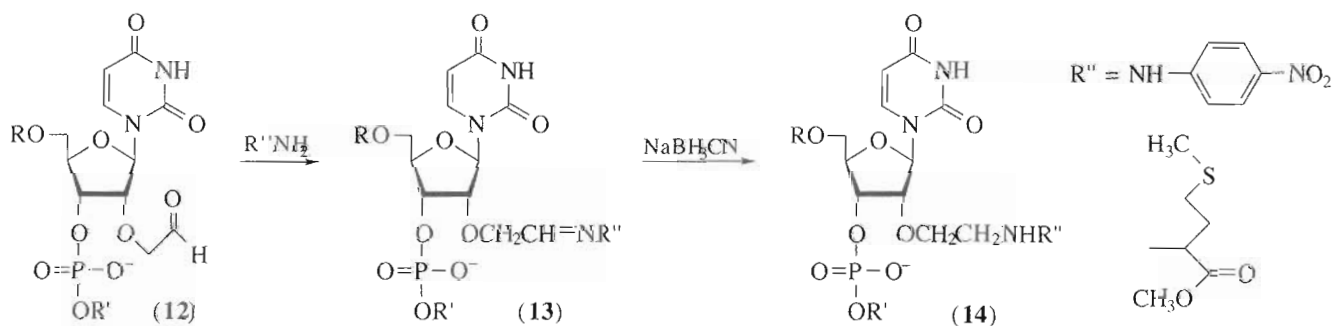
Олигонуклеотид (I) – модель, полученная для отработки условий синтеза, деблокирования, выделения и последующего окисления. Нуклеотид-

ные последовательности олигомеров (II)–(V) содержат фрагмент, комплементарный участку TAR РНК Tat-белка вируса иммунодефицита человека. Строение олигонуклеотидов (I), (III)–(IV) было подтверждено методом масс-спектрометрии.

При действии периодата натрия на модифицированные олигонуклеотиды, содержащие *цис*-диольную группу, были получены олигомеры с альдегидной функцией в 2'-положении углеводного фрагмента (схема 2) T₆U^cT₃. Наличие реакционноспособной 2'-альдегидной группы в олигонуклеотидах было косвенно подтверждено в реакции нуклеофильного присоединения (схема 3) с *n*-нитрофенилгидразином (рис. 1) и метиловым эфиром метионина (рис. 2).

Далее было проведено изучение термической стабильности дуплексов, состоящих из модифицированных олигонуклеотидов, содержащих 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридин и 2'-O-(2-оксоэтил)уридин, и комплементарных ДНК-матриц, по сравнению с термической устойчивостью дуплекса, образованного той же матрицей и немодифицированным олигодезоксирибонуклеотидом. Было обнаружено, что наличие *цис*-диольной и альдегидной группы в 2'-положении уридина не вызывает заметного изменения термической устойчивости дуплекса. Полученные результаты хорошо коррелируют с литературными данными работы [8], где изучалась термическая стабильность ДНК-дуплексов, содержащих вставки 2'-O-алкилнуклеозидов.

Таким образом, синтезировано новое модифицированное производное уридина с *цис*-диольной группой в 2'-положении углеводного фрагмента – 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридин – и его 3'-амидофосфит. Получено два новых типа модифицированных олигонуклеотидов, содержащих в 2'-положении углеводного фрагмента *цис*-диольную и альдегидную функции соответственно. Наличие реакционноспособной альдегидной группировки в 2'-положении углеводного фрагмента подтвер-



R, R' – фрагменты олигодезоксирибонуклеотидной цепи.

Схема 3.

дено взаимодействием с *n*-нитрофенилгидразином и метиловым эфиром метионина, что открывает перспективы для получения конъюгатов с протяженными пептидами. Преимуществом предложенной модификации является невозможность протекания реакции β-элиминирования и, как следствие, разрушения конъюгата с соединением, содержащим нуклеофильную функцию. Показано, что термическая стабильность ДНК-дуплексов, содержащих модифицированные звенья, практически не изменяется по сравнению с природными аналогами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан, *N,N*-диизопропиламидо-β-цианэтилхлорфосфит, 2-мезитилсульфохлорид, 4,4'-диметокситритилхлорид, *o*-нитрофенол, *p*-толуолсульфокислота фирмы "Aldrich" (США), фенилглиоксилонитрил фирмы "Acros Organics" (Великобритания), 5'-*O*-диметокситритил-3'-(*N,N*-диизопропиламидо)-β-цианэтилфосфиты 2'-дезоксирибонуклеозидов фирмы "Glen Research" (США), 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисилоксан фирмы "Lancaster" (Великобритания), 2-*tert*-бутилимино-2-диэтиламино-1,3-диметилпергидро-1,3,2-диазафосфорин, 4-(*N,N*-диметиламино)пиридин, уридин, триметилхлорсилан, триэтиламин, фторид тетрабутиламмония, трифенилфосфин, трихлоруксусная кислота, аллилметилкарбонат, три(дибензиденацетон)дипалладий, *N*-оксид *N*-метилморфолина, тетраоксид осмия, 2-нитробензальдоксим фирмы "Fluka" (Швейцария), *N,N*-диизопропилэтиламин, 1,1,3,3-тетраметилгуанидин фирмы "Merck" (ФРГ), тетразол фирмы "Pharmacia" (Швеция).

Тонкослойную хроматографию осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) с использованием следующих систем растворителей: хлороформ-этанол, 95 : 5 (А), хлороформ-этанол, 9 : 1 (Б), гексан-этилацетат, 2 : 1 (В), гексан-этилацетат, 1 : 1 (Г), хлористый метилен-триэтиламин, 98 : 2 (Д). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле (Kieselgel 60, Merck, ФРГ) с использованием следующих систем растворителей: градиент концентрации этилацетата в гексане от 0 до 25% (а), градиент концентрации метанола в хлороформе от 0 до 5% (б).

¹H-ЯМР-спектры и ¹³C-ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker DRX-500 в CDCl₃, используя примесь CHCl₃ как внутренний стандарт. При записи ¹³C-ЯМР-спектров использовалась широкополосная развязка протонов. При расшифровке 2D-спектров использовали COSY- и HMQC-методики, адаптированные для данного прибора. Приведены химические сдвиги (δ, м.д., погрешность 0.01 м.д.) и константы спин-спинового взаимодействия (*J*, Гц, погрешность 0.25 Гц).

Масс-спектры регистрировали на приборе Finnigan MAT VISION 2000 (MALDI TOF).

Оптическое поглощение и УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. 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.

3',5'-*O*-(Тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-уридин (2) получали по методике [6]. Выход соединения (2) 95%, *R*_f 0.55 (Б).

3',5'-*O*-(Тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-*O*⁴-(2-нитрофенил)уридин (3) получали по методике [6]. Выход соединения (3) 65%, *R*_f 0.12 (В).

3',5'-*O*-(Тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-2'-*O*-аллил-*O*⁴-(2-нитрофенил)уридин (4) получали аналогично методике [6]. Соединение (3) (3.53 г, 5.8 ммоль) высушивали упариванием с пиридином (3 × 10 мл), растворяли в абсолютном тетрагидрофуране (17 мл) и добавляли аллилметилкарбонат (0.68 мл, 11.6 ммоль). Далее при перемешивании при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли раствор три(дибензиденацетон)дипалладия (53 мг, 58 мкмоль) и трифенилфосфина (60 мг, 0.23 ммоль) в абсолютном тетрагидрофуране (12 мл). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин. Полноту прохождения реакции контролировали методом ТСХ в системе растворителей В. Реакционную смесь упаривали на ротационном испарителе и очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (система а). Выход соединения (4) 90%, *R*_f 0.6 (В). MALDI-TOF-MS: *m/z* 647.2 (*M*⁺); рассчитано 647.8 (C₃₀H₄₆N₃O₉Si₂).

3',5'-*O*-(Тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-2'-*O*-аллилуридин (5) получали аналогично методике [6]. Выход соединения (5) 85% (2.32 г, 4.4 ммоль), *R*_f 0.8 (Г). ¹H-ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 9.35 (уш. д, 1H, NH), 7.92 (д, 1H, H₆, *J*_{5,6} 8.1 Гц), 5.95 (м, 1H, H₂'), 5.76 (м, 1H, H₁'), 5.69 (м, 1H, H₅'), 5.40 (дд, 1H, H₃'а, *J*_{H₃'а, H₃'б} 1.8 Гц), 5.20 (дд, 1H, H₃'б), 4.39 (м, 2H, H₁'), 4.27–4.00 (м, 5H, H₂', H₃', H₄', H₅'), 1.12–0.95 (м, 28H, Pr^t).

3',5'-*O*-(Тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-2'-*O*-(2,3-дигидроксипропил)уридин (6). Соединение (5) (2.32 г, 4.4 ммоль) растворяли в тетрагидрофуране (60 мл). К блочному раствору при перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре добавляли раствор *N*-оксида *N*-метилморфолина (0.87 г, 5.3 ммоль) в воде (20 мл) и раствор тетраоксида осмия (22 мг, 88 мкмоль) в тетрагидрофуране (9 мл). Полноту прохождения реакции контролировали методом ТСХ в системе растворителей Б. Реакцию вели 3 ч при комнатной температуре и 72 ч при 0°C, затем останавливали

вали добавлением насыщенного раствора тиосульфата натрия (1 мл). Далее реакционную смесь разбавляли хлороформом (50 мл) и промывали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (50 мл) и водой (2 × 50 мл). Органическую фракцию сушили над безводным сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывали, реакционную смесь упаривали на ротационном испарителе и очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле в системе растворителей (б).

Выход соединения (6) 90% (2.25 г, 4.0 ммоль), R_f 0.25 (б). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.80 (уш. д, 1H, NH), 7.88 (д, 1H, H6, $J_{5,6}$ 8.1 Гц), 5.74 (д, 1H, H1'), 5.72 (д, 1H, H5), 4.27–3.74 (м, 1H, H2', H3', H4', H5', H1'', H2'', H3'', 2'-ОН, 3'-ОН), 1.26–0.98 (м, 28H, Prⁱ).

3',5'-O-(Тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-2'-O-(2,3-добензоилоксипропил)уридин (7) получали аналогично методике [9]. Выход соединения (7) 85% (2.62 г, 3.4 ммоль), R_f 0.8 (б). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.78 (уш. д, 1H, NH), 8.1 (м, 4H, *o*-Ph) 7.91 (д, 1H, H6), 7.6 (м, 2H, *p*-Ph), 7.45 (м, 4H, *m*-Ph), 5.78 (м, 1H, H1'), 5.71 (м, 2H, H5, H2''), 4.78–4.70 (м, 3H, H3', H5'), 4.30–4.17 (м, 2H, H3''), 4.02–3.77 (м, 4H, H2', H4', H1''), 1.15–0.97 (м, 28H, Prⁱ).

2'-O-(2,3-Добензоилоксипропил)уридин (8) получали по методике [10]. Выход соединения (8) 85%, R_f 0.25 (б). ^1H -ЯМР ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ , м.д.): 9.79 (уш. д, 1H, NH), 8.10 (м, 1H, H6, $J_{5,6}$ 8.1 Гц), 8.05–8.01 (м, 4H, *o*-Ph), 7.62–7.60 (м, 2H, *p*-Ph), 7.50–7.47 (м, 4H, *m*-Ph), 6.00 (д, 1H, H1', $J_{1',2'}$ 7.00 Гц), 5.65 (м, 1H, H2', $J_{\text{H1}''\text{a}, \text{H2}''}$ 6.88 Гц), 5.54 (м, 1H, H5), 4.79 (тд, 1H, H1''a, $J_{\text{H1}''\text{a}, \text{H1}''\text{b}}$ 11.3 Гц), 4.67 (м, 1H, H1''b, $J_{\text{H1}''\text{b}, \text{H2}''}$ 2.94 Гц), 4.42 (уш. к, 1H, H3', $J_{3',4'}$ 6.50 Гц), 4.26 (к, 1H, H3''a, $J_{\text{H2}''\text{a}, \text{H3}''\text{a}}$ 6.88 Гц, $J_{\text{H3}''\text{a}, \text{H3}''\text{b}}$ 12.0 Гц), 4.23 (м, 1H, H2', $J_{2',3'}$ 7.00 Гц), 4.20 (к, 1H, H3''b, $J_{\text{H2}''\text{b}, \text{H3}''\text{b}}$ 2.94 Гц), 4.02 (ддд, 1H, H4', $J_{4',5'\text{a}}$ 6.04 Гц), 3.87 (т, 1H, H5'a, $J_{5'\text{a}, 5'\text{b}}$ 12.35 Гц), 3.81 (т, 1H, H5'b, $J_{4',5'\text{a}}$ 1.01 Гц), 3.45 (м, 2H, 3'-ОН, 5'-ОН). ^{13}C -ЯМР ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ , м.д.): 166.38 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C=O), 164.7 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C=O), 164.0 (C4), 151.39 (C2), 141.20 (C6), 134.05 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C4), 130.98 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C2, C6), 130.85 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C2, C6), 130.39 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C1), 130.33 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C1), 130.33 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C3, C5), 129.41 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C3, C5), 102.30 (C5'), 88.55 (C2'), 85.89 (C1'), 85.66 (C4'), 83.95 (C3'), 72.00 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C2), 69.86 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C1), 64.06 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C3), 59.37 (C5').

2'-O-(2,3-Добензоилоксипропил)-5'-O-диметокситрилуридин (9) получали по методике [11]. Выход соединения (9) 95%, R_f 0.3 (а). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.79 (уш. д, 1H, NH), 8.1–8.05, 7.65–7.25, 6.95–6.85 (м, 19H, Ph, 4,4'-DMTg, H6), 5.92 (д, 1H, H1'), 5.75 (м, 1H, H2''), 5.3 (д, 1H, H5), 4.8 (дд, 1H, H3''a), 4.72 (м, 1H, 3'-ОН), 4.62 (м, 1H, H3''b), 4.50 (м, 1H, H3'), 4.40 (м, 1H, H1''a), 4.10–4.00 (м, 3H, H1''b, H2', H4'), 3.85 (с, 6H, CH₃O), 3.62 (м, 1H,

H5'a), 3.55 (м, 1H, H5'b). ^{13}C -ЯМР (CHCl_3 , δ , м.д.): 166.38 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C=O), 164.7 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C=O), 164.0 (C4), 151.39 (C2), 141.20 (C6), 134.05 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C4), 130.98 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C2, C6), 130.85 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C2, C6), 130.39 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C1), 130.33 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C1), 2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C3, C5), 129.41 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C3, C5), 102.30 (C5'), 88.55 (C2'), 85.89 (C1'), 85.66 (C4'), 83.95 (C3'), 72.00 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C2), 69.86 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C1), 64.06 (2'-O-(2,3-(OBz)₂Pr), C3), 59.37 (C5').

3'-(N,N-Днизопропиламидо)-β-цианэтилфосфит 2'-O-(2,3-добензоилоксипропил)-5'-O-диметокситрилуридина (10) получали по методике [12]. Выход соединения (10) 80%, R_f 0.4 (д). MALDI-TOF-MS: m/z 1029.0 (M^+); рассчитано 1029.1 ($\text{C}_{56}\text{H}_{61}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{P}$).

Автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов (I)–(V) осуществляли амидофосфитным методом на 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 абсолютном 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.

Деблокирование олигонуклеотидов после синтеза, анализ реакционных смесей и выделение олигонуклеотидов проводили в условиях, аналогичных описанным в работе [7].

Строение олигонуклеотидов (I), (III) и (IV) было подтверждено методом масс-спектрометрии. MALDI-TOF-MS: (I) m/z 3054.31 (M^+); рассчитано 3056.02 ($\text{C}_{102}\text{H}_{135}\text{N}_{20}\text{O}_{71}\text{P}_9$). (III) m/z 4596.23 (M^+); рассчитано 4598.01 ($\text{C}_{146}\text{H}_{187}\text{N}_{57}\text{O}_{89}\text{P}_{14}$). (IV) m/z 4575.73 (M^+); рассчитано 4572.99 ($\text{C}_{146}\text{H}_{188}\text{N}_{54}\text{O}_{90}\text{P}_{14}$).

Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих альдегидную группу в 2'-положении углеводного фрагмента. Окисление модифицированных олигонуклеотидов (I)–(V) проводили по измененной методике, описанной в работе [1]. Модифицированный олигонуклеотид (0.5 ОЕ₂₆₀) растворяли в 0.1 М ацетатном буфере (50 мкл, рН 4.6) и добавляли 5 мМ раствор периодата натрия (10 мкл). Реакцию вели 30 мин при комнатной температуре. Олигонуклеотиды осаждали, прибавляя к реакционной смеси 100 мкл 2 М перхлората лития и 1 мл ацетона, пересаждали и промывали 300 мкл ацетона. Анализ полученных продуктов проводили с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте [7].

Реакция модифицированного олигонуклеотида, содержащего альдегидную группу в 2'-положении углеводного фрагмента, с *n*-нитрофенилгид-

разином. Модифицированный олигонуклеотид (0.4 ОЕ₂₆₀) растворяли в 0.1 М фосфатном буфере (40 мкл, рН 8.0) и добавляли 0.1 М раствор *p*-нитрофенилгидразина в ДМФА (40 мкл). Реакцию вели 3 ч при 55°C, после чего к реакционной смеси добавляли 0.5 М раствор цианборгидрида натрия (50 мкл) и оставляли на ночь при комнатной температуре. Олигонуклеотиды осаждали, прибавляя к реакционной смеси 100 мкл 2 М перхлората лития и 1 мл ацетона, переосаждали и промывали 300 мкл ацетона. Анализ полученных продуктов проводили с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте.

Реакция модифицированного олигонуклеотида, содержащего альдегидную группу в 2'-положении углеводного фрагмента, с метиловым эфиром метионина. Модифицированный олигонуклеотид (0.4 ОЕ₂₆₀) растворяли в 0.3 М растворе метилового эфира метионина (40 мкл, рН 8.0) и добавляли ДМФА (40 мкл). Реакцию вели 24 ч при 37°C, после чего к реакционной смеси добавляли 0.5 М раствор цианборгидрида натрия (50 мкл) и оставляли на ночь при комнатной температуре. Олигонуклеотиды осаждали, прибавляя к реакционной смеси 100 мкл 2 М перхлората лития и 1 мл ацетона, переосаждали и промывали 300 мкл ацетона. Анализ полученных продуктов проводили с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность научным сотрудникам Е.М. Волкову и Е.М. Зубину (химический факультет МГУ) за участие в обсуждении данной работы.

Работа выполнена при поддержке гранта Wellcome Trust (№ 057361) и программы "Университеты России – фундаментальные исследования" (№ 015.05.02.15).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mikhailov S.N., De Bryun A., Herdewijn P. // *Nucleosides Nucleotides*. 1995. V. 14. P. 481–485.
2. Mikhailov S.N., Efimtseva E.V., Gurskaya G.V., Fomitcheva M.V., Meshkov S.V. // *J. Carbohydr. Chem.* 1997. V. 16. P. 75–80.
3. Lawrence A.J., Pavey J.B., Cosstick R., O'Neil I.A. // *J. Org. Chem.* 1996. V. 61. P. 9213–9222.
4. Brevnov M.G., Gritsenko O.M., Mikhailov S.N., Efimtseva E.V., Ermolinsky B.S., van Aerschot A., Herdewijn P., Ropyk A.V., Gromova E.S. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3302–3309.
5. Tinitckaya V.L., Rusakova E.E., Memelova L.V., Kochetkov S.N., van Aerschot A., Herdewijn P., Efimtseva E.V., Ermolinsky B.S., Mikhailov S.N. // *FEBS Lett.* 2000. V. 442. P. 20–24.
6. Sproat B.S., Iribarren A.M., Beijer B., Piels U., Lamond A.I. // *Nucleosides Nucleotides*. 1991. V. 10. P. 25–36.
7. Орецкая Т.С., Ибрагим Х.К.Х., Волков Е.М., Романова Е.А., Таулицкий В.Н., Шабарова З.А. // *Биоорган. химия*. 1994. Т. 20. С. 967–973.
8. Inoue H., Hayase Y., Iwai S., Ohtsuka E. // *FEBS Lett.* 1987. V. 215. P. 327–330.
9. Holy A., Soucek M. // *Tetrahedron Lett.* 1971. V. 12. P. 185–188.
10. Matsuda A., Yasuoka J., Sasaki T., Ueda T. // *J. Med. Chem.* 1991. V. 34. P. 999–1002.
11. Jones R.F. // *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* / Ed. M.J. Gait. Oxford: Washington DC IRL Press, 1984. P. 23–24.
12. Beaucage S.L. // *Protocols for Oligonucleotides and Analogs; Synthesis and Properties* / Ed. S. Agrawal. Towata: Humana Press Inc., 1993. P. 33–63.

Synthesis and Properties of Modified Oligodeoxyribonucleotides Containing 2'-O-(2,3-Dihydroxypropyl)uridine and 2'-O-(2-Oxoethyl)uridine

T. S. Zatsepin*, A. V. Kachalova*, E. A. Romanova*,
D. A. Stetsenko**, M. J. Gait**, and T. S. Oretskaya*#

*Chemical Department and Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow V-234, 119899 Russia

**Laboratory of Molecular Biology, Medical Research Council, Cambridge, United Kingdom

A new uridine derivative, 2'-O-(2,3-dihydroxypropyl)uridine, and its 3'-phosphoramidite were obtained for direct introduction into oligonucleotides during automated chemical synthesis. Oligonucleotides 10 to 15 nt long harboring 2'-O-(2,3-dihydroxypropyl)uridine residues were synthesized; periodate oxidation of these oligomers gave oligonucleotides containing 2'-O-(2-oxoethyl)uridine residues. The presence of a reactive aldehyde group in 2' position of the carbohydrate moiety was confirmed by the interaction with *p*-nitrophenylhydrazine and methionine methyl ester. The thermostability of DNA duplexes containing modified units is practically indistinguishable from that of the natural analogues.

Key words: modified oligodeoxyribonucleotides, 2'-O-(2,3-dihydroxypropyl)uridine, 2'-O-(2-oxoethyl)uridine

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 939-3148; fax: +7 (095) 939-3181; e-mail: oretskaya@bioorg.chem.msu.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.