



УДК 547.963.32 + 547.416

ПОЛУЧЕНИЕ 4-(N-2-ХЛОРЭТИЛ-N-МЕТИЛАМИНО)  
БЕНЗИЛ-5'-ФОСФАМИДОВ РИБООЛИГОАДЕНИЛАТОВ  
И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С рРНК и ДНК *E. COLI*

Гимаутдинова О. И., Гринева Н. И., Карпова Г. Г.,  
Ломакина Т. С., Шелпакова Е. Л.

Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР

Разбавленные растворы продуктов ацилирования олигорибонуклеотидов мезитилкарбонилхлоридом при обработке водным бикарбонатом триэтиламонния образуют с выходом 60—80% 5'-мезитилкарбонилфосфаты. В найденных условиях олигорибонуклеотиды деградируют незначительно, и степень изомеризации фосфодиэфирных связей не превышает 17%. При фосфорилировании полученными 5'-мезитилкарбонилфосфатами олигорибонуклеотидов 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламина с количественным выходом синтезированы их 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил-5'-фосфамиды. 5'-Фосфамиды гекса- и гептарибоаденилатов с рРНК и ДНК *E. coli* образуют комплексы, в которых эффективно алкилируют нуклеиновые кислоты. Определена константа скорости реакции  $(MsCO)pA$  с  $C1RCH_2NH_2$  в диметилформамиде при 50°.

С целью получения фрагментов ДНК, содержащих олиготимидиловые последовательности на 3'-конце, методом комплементарно адресованной фрагментации ДНК [1] мы в данной работе исследовали образование необходимых для этого алкилирующих производных олигорибоаденилатов, 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил-5'-фосфамидов  $(C1RCH_2NH)(pA)_{5-7}$ , с помощью 5'-мезитилкарбонилфосфатов  $(MsCO)(pA)_{5-7}$  и  $P^1$ -дифенил- $P^2$ -олигорибонуклеотид-5'-пирофосфатов  $(PhO)_2p(pA)_7$ , а также взаимодействие этих фосфамидов с рРНК и ДНК.

Ранее было исследовано алкилирование РНК [2,3] и ДНК [4] производными олигонуклеотидов, содержащими алкилирующую группировку на 3'-конце фрагмента, и показана принципиальная возможность образования комплексов с рРНК и высокоэффективного алкилирования этих комплексов реагентами, имеющими алкилирующую группу на 5'-конце гекса- и тетрануклеотидов  $(C1RCH_2NH)(pN)_{4,6}$  [5]. Для получения алкилирующих фосфамидов олигодезоксинуклеотидов мы применяли фосфорилирование  $C1RCH_2NH_2$  с помощью  $(PhO)_2p(pN)_n$  [6, 7], как это описано для получения фосфамидов нуклеотидов [8, 9]. Однако этот процесс даже в оптимальных условиях сопровождается образованием примеси симметричного бис-продукта [6]. Другой метод — ацилирование 5'-фосфатов олигодезоксинуклеотидов мезитилкарбонилхлоридом  $(MsCOCl)$  приводит к избирательной

Сокращения:  $C1RCH_2NH_2$  — 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламин;  $(C1RCH_2NH)(pA)_n$  — 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил-5'-фосфамиды олигорибоаденилатов  $(pA)_n$  с длиной цепи  $n = 5-7$ ;  $MsCOCl$  — мезитилкарбонилхлорид.



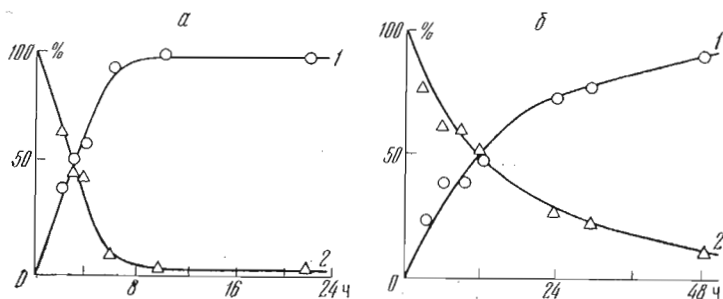


Рис. 1. Кинетические кривые образования  $(\text{CIRCH}_2\text{NH})\text{pA}$  (1) и убыли  $(\text{MsCO})\text{pA}$  (2) при  $50^\circ$  в абс. диметилформамиде. Концентрация  $(\text{MsCO})\text{pA}$  — 12,5 мМ,  $\text{CIRCH}_2\text{NH}_2$  — 1,17 М (а) и 0,38 М (б)

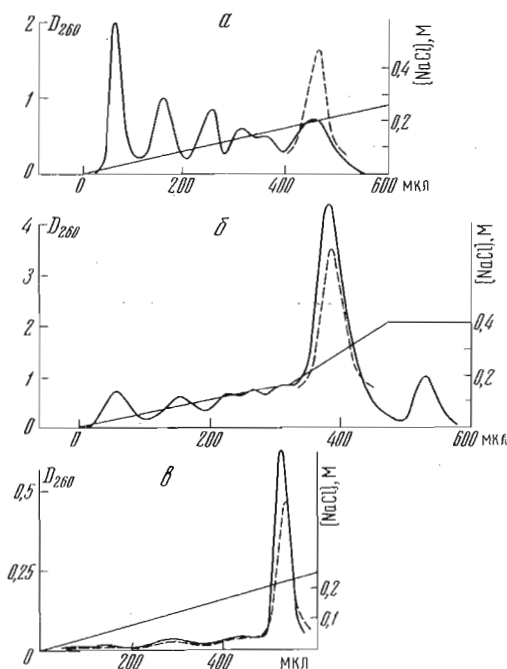


Рис. 2. Профили микроколоночной хроматографии по зарядам продуктов ацилирования  $(\text{pA})_7$  (а и б) и  $(\text{Up})_4\text{U}$  (а) с помощью  $\text{MsCOCl}$  после обработки их растворами: а — пиридин — вода — диметилформамид (1 : 1 : 2) при  $5^\circ$ ; б — 0,6 М бикарбонат триэтиламония при  $5-20^\circ$ ; в — 0,8% водный цетилтриметиламмонийбромид при  $5-20^\circ$ . Пунктиром обозначен исходный олигонуклеотид

при  $0-20^\circ$  приводит к  $(\text{MsCO})(\text{pA})_7$  с выходом 48—70% (рис. 2б). Заметное влияние на выход  $(\text{MsCO})(\text{pA})_7$  при этой обработке оказывает концентрация продуктов ацилирования. При 0,6—1,2 мМ концентрации последних он составляет 48%, разбавление до 0,06 мМ повышает выход до 70%. Производные олигоуридилатов дают больший выход 5'-ацилфосфатов, чем производные олигоаденилатов, и обработка продуктов ацилирования  $(\text{Up})_4\text{U}$  водным раствором цетилтриметиламмонийбромида в диметилформамиде ведет почти к количественному выходу олигомера исходной длины (рис. 2в). Непродолжительная обработка ( $\sim 1$  ч) продуктов ацилирования водным пиридином, водными растворами перечисленных выше солей в пиридине или диметилформамиде с последующим выдерживанием с бикарбонатом триэтиламония позволяет выделить до 60%  $(\text{MsCO})(\text{pA})_7$  в смеси с

Состав и характеристика смеси фосфамидов, полученной через мезитоильное производное из (pA)<sub>7</sub> (рис. 3)

Фракция	Соединение	* ε <sub>260</sub> · 10 <sup>-3</sup>	Содержание, мол. % (по [ <sup>14</sup> C])	Молярное соотношение амин/олигонуклеотид
1	CIRCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	14,6 [6]	<2	
2	(CIRCH <sub>2</sub> NH) pA > p	25,7 [6]	9,4	0,8
3	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) <sub>2</sub> > p	39	9,6	0,6
4	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) <sub>3</sub> > p	50	7,3	0,7
5	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) <sub>4</sub> > p	61	7,9	0,9
6	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) <sub>5</sub> > p	73	4,5	—
7	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) <sub>6</sub> > p	85	52	0,83
	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) <sub>7</sub>			
8	Не идентифицирован		9,3	—

\* ε<sub>260</sub> вычисляли суммированием ε<sub>260</sub> (CIRCH<sub>2</sub>NH)pA [6] и олигоаденилатов соответствующей длины [28].

Таблица 2

Состав и характеристика смеси, полученной после ацилирования (pA)<sub>7</sub> дифенилхлорфосфатом и обработки [<sup>14</sup>C]CIRCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> \*

Фракция	Соединение	Содержание, мол. % (по [ <sup>14</sup> C])	Молярное соотношение амин/олигонуклеотид
1	CIRCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	15–28 **	—
2	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) > p	11,5	—
3	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) <sub>2</sub> > p	10,0	—
4	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) <sub>3</sub> > p	9,9	0,51
5	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) <sub>4</sub> > p	10,7	0,70
6	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) <sub>5</sub> > p	14,1	0,61
7	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) <sub>7</sub> и	23,0	0,93
	(CIRCH <sub>2</sub> NH) (pA) <sub>6</sub> > p		
8	Не идентифицирован	20,7	—

\* Пирофосфат на ВД-целлюлозе не разделяли. На DEAE-целлюлозу (30 мкл) нанесли 0,234 ОЕ<sub>260</sub> и элюировали 600 мкл градиента NaCl от 0 до 0,18 М.

\*\* От суммы с фосфамидами.

(MsCO)(pA)<sub>6</sub> > p. Это обстоятельство, видимо, связано с тем, что продукты ацилирования не так быстро реагируют с водой, как следовало бы ожидать от фосфоциклотриэфиров [14]. Вероятно, процесс превращения последних протекает через образование менее активных промежуточных веществ.

На рис. 3 приведено разделение по зарядам продуктов ацилирования (pA)<sub>7</sub> с помощью MsCOCl, обработанных водным пиридином и затем 0,6 М бикарбонатом триэтиламмония после их отделения от олигонуклеотидов на ВД-целлюлозе, а также разделение полученных из смеси (MsCO)(pA)<sub>n</sub> фосфамидов, характеристики которых приведены в табл. 1. Заряд веществ каждой фракции, УФ-поглощение и радиоактивность этих веществ показывают, что содержание в них остатка амина относительно олигоаденилата близко эквимолярному (табл. 1). Содержание каждого из олигомеров, кроме исходного, колеблется от 4,5 до 9,6%. Столько же, вероятно, содержится и (CIRCH<sub>2</sub>NH) (pA)<sub>6</sub> > p, который имеет с (CIRCH<sub>2</sub>NH) (pA)<sub>7</sub> одинаковый заряд и не отделяется от него. Выход (CIRCH<sub>2</sub>NH) (pA)<sub>7</sub> в этих условиях составляет 44%. Эта величина и равномерное распределение продуктов расщепления (в среднем 8%) указывают на расщепление одной из связей в половине молекул исходного гептамера.

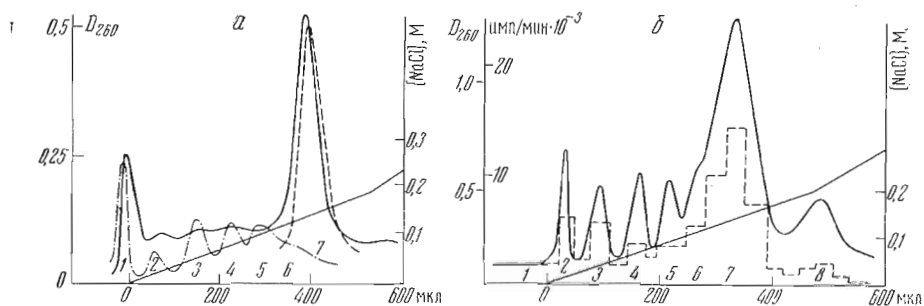


Рис. 3. Профили микроколоночной хроматографии по зарядам: а: — — ацилофосфаты  $(MsCO)(pA)_n$ ; — · — · — олигонуклеотиды, не содержащие заместителей (хроматография на ВД-целлюлозе); — — — исходный  $(pA)_7$ ; б: — — фосфамиды  $[^{14}C](CIRCH_2NH)(pA)_n$ . На колонку с 50 мкл DEAE-целлюлозы нанесено 0,36  $OEt_2$ ; — — — радиоактивность

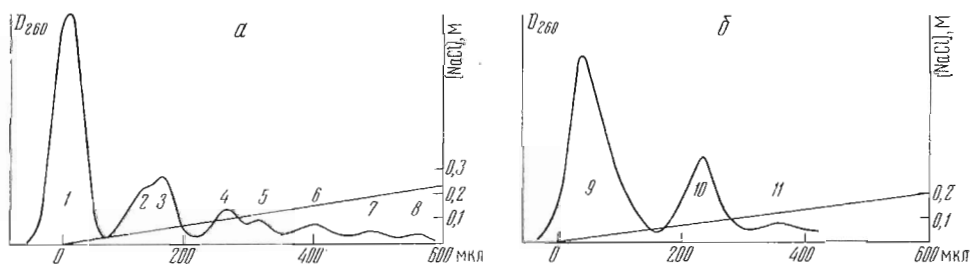


Рис. 4. Профили микроколоночной хроматографии по зарядам: а —  $T_3$ -РНКазного гидролизата  $(MsCO)(pA)_7$ ; б — пириимидил-РНКазного гидролизата  $(U)_4U$ , обработанного  $MsCOCl$ , затем 8% водным бромидом цетилтриметиламмония — диметилформамидом. 1 —  $A + Ap$ , 2 —  $(Ap)_2$ , 3 —  $(MsCO)pAp$ , 4 —  $(Ap)_3$ , 5 —  $(MsCO)p(Ap)_2$ , 6 —  $(Ap)_4$ , 7 —  $(Ap)_5$ , 8 —  $(Ap)_6$ , 9 —  $U + Up$ , 10 —  $(Up)_2$ , 11 —  $(Up)_3$

Таким образом, при обработке продуктов ацилирования олигорибонуклеотидов  $MsCOCl$  водным бикарбонатом триэтиламмония можно получать их 5'-ацилфосфаты с 70—80% выходом; при этом в олигомерах длиной в 6—10 нуклеотидов расщепляется менее 30% всех связей или 3—5% каждой.

Для анализа изомеризации межнуклеотидных связей в условиях предлагаемой обработки  $(MsCO)(pA)_7$  гидролизовали РНКазой  $T_3$  и  $(U)_4U$  — пириимидил-РНКазой. Их гидролизаты делили на DEAE-целлюлозе (рис. 4). По соотношению количества и длины негидролизующихся олигомеров (20 и 26%) степень изомеризации в производном  $(pA)_7$  составила 17%, в  $(U)_4U$  — 15%, т. е. в половине молекул изомеризована одна связь.

Согласно ряду работ [17—19], олигонуклеотиды, содержащие 2'—5'-фосфодиэфирные связи, способны к комплементарным взаимодействиям с нуклеиновыми кислотами, и их константы связывания лишь незначительно отличаются от констант связывания природных олигомеров. Это позволяет надеяться, что некоторая доля изомерных связей в алкилирующих производных принципиально не затруднит их комплексообразование с нуклеиновыми кислотами.

Согласно работе [15], а также данным рис. 3, анализ фосфамидных производных позволяет судить о расщеплении олигонуклеотидов на стадии ацилирования их мезгилленкарбонилхлоридом. Это представляет особый интерес для изучения превращений при образовании  $(PhO)_2p(pN)_n$  — активных производных олигомеров, которые нельзя хроматографировать без заметных превращений. Мы исследовали состав смеси, полученной фос-

форилированием  $[^{14}\text{C}]\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  с помощью  $(\text{PhO})_2\text{p}(\text{pA})_7$ . Эта смесь содержала фосфамиды разных зарядов, которые при элюции солевыми растворами на 70—85% задерживались на ВД-целлюлозе. Фосфамиды каждой фракции содержали амин и олигонуклеотид в соотношении, близком эквимолярному (табл. 2), и имели от 2 до 7 зарядов. Олигомеры, не содержащие ароматического заместителя (по УФ-поглощению — 15—30%), представлены более короткими производными. Их содержание несколько меньше, чем при ацилировании олигонуклеотидов с помощью  $\text{MsCOCl}$  [15].

Это означает, что при действии  $(\text{PhO})_2\text{POCl}$  на олигорибонуклеотиды и последующей обработке также происходит расщепление фосфодиаэфирных связей. Доля коротких фосфамидов (табл. 2) здесь также практически одинакова ( $\sim 10$ —14% каждого), но несколько выше, чем в опыте с  $(\text{MsCO})(\text{pA})_7$ . Эти величины означают, что расщепление каждой связи составляет 10—14%, выход длинных фосфамидов всего 23%, а молекула гептамера претерпевает расщепление 1—1,5 связей.

Надо отметить, что олигорибонуклеотиды, не содержащие 5'-концевого фосфата  $(\text{Np})_{n-1}\text{N}$ , после ацилирования как  $\text{MsCOCl}$ , так и  $(\text{PhO})_2\text{POCl}$  (без водной обработки или при непродолжительном действии воды) все же присоединяют остаток аминов, превращаясь, вероятно, в фосфамиды фосфодиаэфиров. Степень присоединения аминов при этом тем больше, чем выше концентрация хлорангидрида в реакционной смеси на первой стадии. Так, при возрастании концентрации  $\text{MsCOCl}$  с 25 до 250 мМ степень включения амина  $[^{14}\text{C}]\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  в 3—5 мМ растворе  $(\text{Np})_5\text{N}$  увеличивается с 0,22 до 0,56 моль на 1 моль олигонуклеотида. 15 мМ  $(\text{PhO})_2\text{POCl}$  способствует включению 0,07 моль, а 150 мМ — 0,44 моль амина на 1 моль  $(\text{Np})_5\text{N}$ . Образующиеся соединения достаточно лабильны и отщепляют амин в водной среде при pH 7,8—8,6 в соответствии со свойствами 3'(2')-фосфамидов нуклеозидов и нуклеозид-2',3'-циклофосфатов [20]. При pH 8—9 эти соединения подвергаются дальнейшему расщеплению межнуклеотидных связей; образуется некоторое количество производных с фосфомоноэфирной группой, отщепляемой фосфомоноэстеразой (от 0,16 до 0,45 моль фосфата на моль  $(\text{Np})_5\text{N}$ ). Ацилирование мезитилкарбонилхлоридом  $(\text{Up})_4\text{U}$ , обработка продуктов ацилирования 50% водным пиридином и затем бензиламином в безводной среде ведет к образованию смеси от моно- до пентуридилатов. Судя по микроколоночной хроматографии по зарядам, среди них присутствуют олигомеры, содержащие гидрофобные заместители, задерживающие их на колонке. При pH 8 (37°, 8 ч) эти соединения полностью разрушаются. В контрольном опыте  $\text{U} > \text{p}$ , обработанный 1 М бензиламином в диметилформамиде при 50° в течение суток, образует некоторое количество  $\text{Up}$ , но бензилфосфамидов при этом не обнаруживается. Следовательно, при взаимодействии продуктов ацилирования олигорибонуклеотидов с аминами реакция протекает по активированным межнуклеотидным фосфатным группам; если активные группировки не разрушены водной обработкой, то при действии на них аминов в безводной среде образуются, вероятно, фосфамиды фосфодиаэфиров, являющиеся причиной дальнейшего расщепления олигонуклеотидов.

Будучи активными фосфорилирующими соединениями,  $(\text{PhO})_2\text{p}(\text{pV})_n$  все же выдерживают хроматографию и электрофорез на бумаге [21]. Это указывает на возможность подбора условий для разрушения активированной формы межнуклеотидных фосфатов в них.

Алкилирующие производные бензилиденолигонуклеотидов образуют с рРНК, тРНК и ДНК комплементарные комплексы, и в них эффективно алкилируют нуклеиновые кислоты [1—4].

Чтобы установить пригодность реагентов, полученных предлагаемым методом, к комплементарно адресованной модификации, мы проверили их способность к образованию комплексов с рРНК и ДНК *E. coli* и к алкилированию в этих комплексах. Испытывались реагенты, выделенные микроколоночной хроматографией из смеси фосфамидов разной длины и смеси

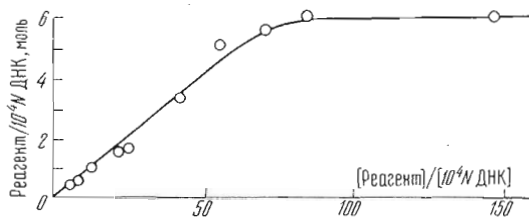


Рис. 5. Зависимость степени алкилирования ДНК с помощью  $(\text{ClRCH}_2\text{NH})(\text{pA})_7$  при  $20^\circ$  в буфере 2 от концентрации реагента

фосфамидов олигоаденилатов без разделения, полученных фосфорилированием  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  с помощью как  $(\text{MsCO})(\text{pA})_7$ , так и  $(\text{PhO})_2\text{p}(\text{pA})_7$ . Как те, так и другие с рРНК и ДНК при  $0^\circ$  образовывали комплексы, которые были выделены гель-фильтрацией на сефадексе G-75 при  $0^\circ$ . В условиях насыщения рРНК связывала 8 из 42—52 моль реагента, а к  $10^4$  нуклеотидов ДНК присоединялось 25—26 из 60 моль  $(\text{ClRCH}_2\text{NH})(\text{pA})_7$  в смеси с  $(\text{ClRCH}_2\text{NH})(\text{pA})_6 > \text{p}$ . Число участков связывания фосфамидов гептааденилата и гексааденилата в ДНК оказалось тем же, что и число участков связывания алкилирующего производного гексааденилата с 2', 3'-бензильденовой группировкой [3]. По сравнению с последним в рРНК фосфамиды узнавали лишь 8 участков вместо 27—50 в тех же условиях [22]. При выдерживании растворов выделенных комплексов при  $20^\circ$  реагенты ковалентно присоединялись к РНК и ДНК. Повышение температуры и разбавление растворов при выделении комплексов уменьшало степень ковалентного присоединения реагента к рРНК до 4 моль на моль рРНК. Алкилирование рРНК при  $20^\circ$  без выделения комплекса при той же концентрации реагента, что и при комплексообразовании, дает степень модификации, равную степени связывания. Если алкилирование ДНК проводили при  $20^\circ$ , после выделения комплекса при  $0^\circ$  степень модификации оказывалась существенно ниже степени связывания при  $0^\circ$ . Из 26 моль реагента ковалентно присоединялось только 6. В условиях насыщения без выделения комплекса (при тех же концентрациях ДНК) степень алкилирования также составила 6 остатков реагента на  $10^4$  нуклеотидов ДНК (рис. 5). Сходные результаты по алкилированию ДНК давали реагенты, полученные ацилированием  $(\text{pA})_7$  мезитиленкарбонилхлоридом и дифенилхлорфосфатом.

С увеличением избытка реагента степень модификации растет (рис. 5). Как и в случае 3'-алкилирующих производных, добавление исходного олигоаденилата ингибирует алкилирование. Так, 1,8-кратный избыток  $(\text{pA})_7$ , добавленный к  $(\text{ClRCH}_2\text{NH})(\text{pA})_7$ , поляжает степень модификации вдвое. Это указывает на взаимодействие реагента с теми же олиготимидиловыми участками ДНК, с которыми ассоциирует олигоаденилат. Одинаковая степень алкилирования ДНК наблюдалась при действии реагентов, как выдержавших хроматографическое разделение, так и не подвергавшихся ему, т. е. выделение реагентов микроколоночной хроматографией не снижает содержания активного хлора в реагентах, свидетельствуя о пригодности предложенных методик для получения алкилирующих производных олигонуклеотидов с модифицирующей группой на 5'-конце.

Свидетельством протекания реакции в комплексе служит и эффективность алкилирования рРНК и ДНК, вычисленная по [23] и составляющая  $(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ , что на 3 порядка выше эффективности алкилирования с помощью  $(\text{ClRCH}_2\text{NH})\text{pU}$  вне комплекса [24].

## Экспериментальная часть

В работе использовались натриевая соль рА фирмы Reanal (Венгрия),  $(\text{pA})_{5-7}$  — производства НИС НГУ (Новосибирск). По описанным методам получали  $\text{MsCOCl}$  [25] и  $(\text{PhO})_3\text{POCl}$  [26];  $(\text{Np})_{n-1}\text{N}$  получали дефосфорилированием  $(\text{pN})_n$  [16] щелочной фосфомоноэстеразой.  $[\text{C}^{14}]\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  удельной активности 12 мКи/ммоль получали, как описано в работе [6]. Хроматографию на бумаге FN-1 (ГДР) проводили в системах: изопропанол — конц.  $\text{NH}_3$  — вода, 7 : 1 : 2 (А); этанол — 1 М ацетат аммония, 7 : 3, рН 7,5 (Б); этанол —  $\text{NH}_3$  — вода, 80 : 2 : 18 (В); *n*-пропанол — аммиак — вода, 50 : 10 : 35 (Г).

Анализ веществ и смесей с помощью хроматографии на DEAE-и ВD-целлюлозе, микроколоночную хроматографию, гидролиз пиридил-РНКазой и фосфомоноэстеразой проводили, как указано в работе [15]. Содержание ковалентного и ионного хлора в фосфамидах определяли до и после гидролиза в 0,3 М КОН с помощью потенциометрического титрования  $\text{AgNO}_3$ , как описано ранее [16].

*Получение  $(\text{ClRCH}_2\text{NH})(\text{pA})_7$ . Метод А.* Цетилтриметиламмониевую соль  $(\text{pA})_7$  (2 мкмоль) высушивали упариванием с безводным диметилформамидом (ДМФ) (3 × 0,3 мл). К остатку в 0,05 мл ДМФ добавляли 0,55 мл 25—29 мМ раствора  $\text{MsCOCl}$  в безводном пиридине; раствор выдерживали 20 мин при 20° и осаждали в 80 мл эфира. Осадок дважды пересаждали из ДМФ в эфир, промывали эфиром, растворяли в 0,5 мл ДМФ, добавляли 0,1 мл 1 М NaI в ацетоне и Na-соль осаждали 15 мл ацетона; через 1 ч осадок отделяли, растворяли при 0° в 30 мл 0,6 М бикарбоната триэтиламмония и выдерживали 3—5 ч при 20°, разбавляли спиртом в 2 раза и упаривали несколько раз, добавляя спирт. Остаток растворяли в 1 мл воды и наносили на колонку (10 мл) с ВD-целлюлозой. Колонку промывали последовательно 200 мл 0,01 М, 200 мл 0,05 М и 50 мл 0,6 М бикарбоната триэтиламмония в 50% спирте. Выход УФ-поглощающего материала 80—90%. Микроколоночная хроматография 2-й фракции по зарядам представлена на рис. 2б. Фракции упаривали, добавляя спирт, и высушивали отгонкой с ДМФ. К остатку добавляли 0,1 мл раствора 109 мкмоль  $[\text{C}^{14}]\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$ , полученного из 28,2 мг его хлоргидрата по методике работы [6], до конечной концентрации  $(\text{MsCO})(\text{pA})_7$  15—20 мМ и  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  — 0,90—0,95 М. Раствор выдерживали в сухой атмосфере 24 ч при 50° и осаждали в эфир: осадок пересаждали из спирта или ДМФ в эфир, промывали эфиром (5 × 5 мл), растворяли в 0,5 мл ДМФ, добавляли 0,1 мл 1 М NaI в ацетоне и Na-соль  $(\text{ClRCH}_2\text{NH})(\text{pA})_7$  осаждали 15 мл ацетона. Через 1 ч осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном до отсутствия радиоактивности в надосадочной жидкости и высушивали над  $\text{P}_2\text{O}_5$  в вакууме. Соотношение олигомер — амин в препарате составляло 1 : 0,92, примесь  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$ , элюирующегося водой или 0,08 М бикарбонатом триэтиламмония при хроматографии на DEAE-сефадексе, не более 2%.  $(\text{MsCO})(\text{pA})_7$  или  $(\text{ClRCH}_2\text{NH})(\text{pA})_7$  из смеси соответствующих производных выделяли также (минуя разделение на ВD-целлюлозе) хроматографией на DEAE-целлюлозе (0,2 × 6 см), уравновешенной 0,01 М трис-НCl (рН 7,3), в 7 М мочеvine (фосфамиды — при 5°). На колонку наносили 20—50 ОЕ<sub>260</sub> в 0,2 мл. Для элюции коротких олигомеров колонку промывали 1,5 мл 0,2 М NaCl в том же растворе и затем гептамеры элюировали 1,5 мл 0,3 М и 1,5 мл 0,5 М NaCl; скорость элюции 2 мл/ч. Фракцию обессоливали на сефадексе G-10 и применяли для алкилирования. По данным микроколоночной хроматографии в градиенте NaCl, в продукте содержалось 85—90% гептамера, по 3—5% пента- и гексамеров, а также ~5% пирофосфатов. Незамещенных олигомеров в продукте не содержится. Относительно  $(\text{pA})_7$   $R_f$   $(\text{ClRCH}_2\text{NH})(\text{pA})_7$  при многодневной хроматографии в системе Г при 5° — 1,1.

*Метод Б.* К раствору 0,59 мкмоль цетилтриметиламмониевой соли



(pA)<sub>7</sub> в 0,02 мл ДМФ добавляли 0,2 мл 0,03 М (PhO)<sub>2</sub>POCl в диоксане и 0,2 мл 34 мМ Вu<sub>3</sub>N до конечной концентрации (pA)<sub>7</sub> — 1—3 мМ, Вu<sub>3</sub>N — 17 мМ, (PhO)<sub>2</sub>POCl — 15 мМ и выдерживали 3 ч при 20°. (Реакцию 10 мМ (Np)<sub>5-6</sub>N проводили в 0,15 М (PhO)<sub>2</sub>POCl и 0,17 М Вu<sub>3</sub>N.) Смесь осаждали в эфир, остаток переосаждали и промывали эфиром; следы эфира удаляли в вакууме. Раствор остатка в 0,6 мл ДМФ, содержащего 59 мг [<sup>14</sup>C]ClRCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, выдерживали 5 ч при 20°. (Концентрация олигомера 11,1 мМ, амина 0,3—1,0 М.) Фосфамид выделяли, как описано выше. Выход (ClRCH<sub>2</sub>NH)(pA)<sub>7</sub> в смеси (ClRCH<sub>2</sub>NH)(pA)<sub>6</sub> > р 23%. Характеристика препарата приведена в табл. 2.

*Влияние условий на образование (MsCO)pA* проверяли по выходу (MsCO)pA и симметричного пиррофосфата, которые определяли хроматографией на бумаге в системах А—В. Контрольным опытом служило ацилирование 10 мМ цетилтриметиламмониевой соли pA 25 мМ MsCOCl при 20—40° в пиридине как описано [10, 11]; в этих условиях выход (MsCO)pA 95—98%; содержание pA 2—5%. Триэтил- и триоктиламмониевые соли pA ацилируются аналогично. Реакция заканчивается за 20 мин. При ацилировании 0,17 М MsCOCl в ДМФ в присутствии 0,17 М Вu<sub>3</sub>N при 20° за 24 ч выход (MsCO)pA 30% и симметричного пиррофосфата 70% (R<sub>f</sub> 0,3 в системе А). В смеси ДМФ — пиридин (1 : 1) при 20° за 45 мин образуется 70% (MsCO)pA.

*Кинетика фосфорилирования ClRCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> 5'-мезитоилфосфатом аденозина.* Реакционную смесь объемом 0,4 мл, содержащую 12,5 мМ цетилтриметиламмониевую соль (MsCO)pA и 1,17 М ClRCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> в безводном ДМФ, выдерживали при 50° в отсутствие влаги, отбирая пробы по 0,04 мл. Пробу осаждали в 10 мл абс. эфира, осадок отделяли центрифугированием, промывали эфиром, растворяли в метаноле и хроматографировали в течение 15 ч на бумаге при 4—5° в системе Б; pA (R<sub>f</sub> 0,17), (ClRCH<sub>2</sub>NH)pA (R<sub>f</sub> 0,55) и (MsCO)pA (R<sub>f</sub> 0,73) элюировали водой и измеряли УФ-поглощение растворов при 260 нм и рН 1, чтобы исключить влияние близко идущего к (MsCO)pA амина ClRCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (R<sub>f</sub> 0,80). Аналогично снимали кинетическую кривую фосфорилирования 0,38 М ClRCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> 0,5 мМ (MsCO)pA в безводном ДМФ. Кинетические кривые даны на рис. 1.

*Получение комплексов с ДНК и рРНК E. coli.* К раствору 1—3 ОЕ<sub>260</sub> ДНК или РНК в 1 мл 0,2 М NaCl и 0,01 М MgCl<sub>2</sub> в 0,01 М трис-НСl, рН 7,4 (буфер 1) при 0° добавляли раствор [<sup>14</sup>C]ClRCH<sub>2</sub>NH(pA)<sub>7</sub>, выделенного ионообменной хроматографией, или смесь фосфамидов, отделенных от примеси амина на ДЕАЕ-целлюлозе в 0,01 М трис-НСl (буфер 2). Комплексообразование проводили при 5—60-кратном избытке реагента. Раствор выдерживали 2 ч при 0° и фильтровали через колонку (43 × 1 см) с сефадексом G-75 при 0° в 0,01 М трис-НСl-буфере. В полимерном пике получали комплекс, во втором — избыточный олигомер. Степень связывания выражали в моль реагента на моль рРНК и 10<sup>4</sup> моль нуклеотидов ДНК, о чем судили по радиоактивности фракций и их оптической плотности при 260 нм. Комплекс оставляли для алкилирования и проверяли на способность к диссоциации гель-фильтрацией при 45° на той же колонке.

*Алкилирование ДНК и рРНК фосфамидами ClRCH<sub>2</sub>NH(pA)<sub>n</sub>* проводили в буфере 1, как в работах [2—4], выдерживая смесь 4 сут при 20°. Непрореагировавший олигомер отделяли на сефадексе G-75 при 45° в буфере 2. Степень модификации в моль амина на моль рРНК или на 10<sup>4</sup> моль нуклеотидов ДНК определяли по радиоактивности и УФ-поглощению фракций.

*Гидролиз РНКазой T<sub>2</sub>* [К Ф 2.7.7.17] (Sankyo, Япония). Раствор 0,06 ОЕ<sub>260</sub> (MsCO)(pA)<sub>7</sub> в 15 мкл воды (рН 4,5) выдерживали с 0,1 ед. акт. фермента при 37° в течение 2 ч, как указано в работе [29]. Гидролизат разбавляли водой и анализировали микроколоночной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе в градиенте NaCl от 0 до 0,25 М в 7 М мочеvine (рис. 4). Степень изомеризации вычисляли как в работе [15].

Авторы благодарят Т. А. Чимитову за помощь при определении констант скоростей фосфорилирования и Е. Ф. Зайчикова и А. Н. Кривошеину за помощь при проведении микроколоночной хроматографии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Мызина С. Д., Фодор И., Баев А. А. (1975) Докл. АН СССР, **223**, 1477—1480.
2. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1974) Молекулярн. биология, **8**, 832—844.
3. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Кузнецова Л. П., Чимитова Т. А., Венстеря Т. В., Шершнёва Л. П., Баев А. А. (1976) Молекулярн. биология, **10**, 1260—1271.
4. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Мызина С. Д., Чемасова А. Н. (1975) Биоорганич. химия, **16**, 1707—1715.
5. Василенко С. К., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Козоровицкий А. Я., Ломакина Т. С., Саарма М. Ю., Ткунов М. П. (1973) Докл. АН СССР, **212**, 1227—1230.
6. Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1972) Ж. общ. химии, **42**, 1630—1634.
7. Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1973) Ж. общ. химии, **43**, 2551—2555.
8. Воробьев О. Е., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1964) Ж. общ. химии, **34**, 359—361.
9. Michelson A. M. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **91**, 1—13.
10. Гатинская Л. Г., Смирнов В. В., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1973) Докл. АН СССР, **212**, 363—366.
11. Носова В. В., Ивовская М. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1975) Вестн. МГУ, № 1, 87—90.
12. Shumyantzeva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. (1976) *Nucleic Acids Res.*, **3**, 903—906.
13. Будкер В. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Кобец Н. Д., Рязанкина О. И. (1977) Биоорганич. химия, **3**, 618—625.
14. Друца В. Л., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1977) Докл. АН СССР, **233**, 91—93.
15. Гимаутдинова О. И., Гринева Н. И., Денисова Л. Я., Ломакина Т. С., Пустошилова Н. М. (1977) Биоорганич. химия, **3**, 1633—1640.
16. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Тигеева Н. Г., Чимитова Т. А. (1977) Биоорганич. химия, **3**, 210—214.
17. Соколова Н. И., Каграманова Н. Г., Долинная Н. Г. (1975) Успехи химии, **44**, 104—133.
18. Michelson A. M., Monny C. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, **149**, 107—126.
19. Lipsett M. N. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 1256—1260.
20. Преображенская Н. Н., Шабарова З. А. (1967) Докл. АН СССР, **174**, 100—104.
21. Сайкович Е. Г. (1973) Канд. дис. «Специальные реагенты для метилирования нуклеиновых кислот», Новосибирск.
22. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Шамовский Г. Г. (1974) Молекулярн. биология, **8**, 832—844.
23. Бевлмецкая Л. З., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П. (1977) Биоорганич. химия, **3**, 903—913.
24. Богачев В. С., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1973) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 4, 97—104.
25. Синтезы орг. препаратов (1952) т. 3, с. 462—463, Изд-во иностр. лит., М.
26. Brigg R., Müller H. (1939) *Chem. Ber.*, **72**, 2121—2130.
27. Foster A. V., Overend W. G., Stacey M. (1951) *J. Chem. Soc.*, 980—987.
28. Барам Г. И., Беликов С. И., Веняминова А. Г., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Козоровицкий А. Я., Шамовский Г. Г. (1972) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 1, 115—120.
29. Avdonina T. A., Kisselev L. L. (1974) *FEBS Lett.*, **39**, 283—286.

Поступила в редакцию  
30.V.1977

PREPARATION OF 4-(N-2-CHLOROETHYL-N-METHYLAMINO)BENZYL  
RIBOOLIGOADENYLATE 5'-PHOSPHAMIDES AND THEIR INTERACTION  
WITH *E. COLI* rRNA AND DNA

GUIMAUTDINOVA O. I., GRINEVA N. I., KARPOVA G. G., LOMAKINA T. S.,  
SHELPAKOVA E. L.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch  
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

With the purpose of preparing the fragments from DNA which contains 3'-terminal oligothymidylic sequences, the conditions for obtaining the phosphamides alkylating derivatives have been searched. By phosphorylating 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylamine ( $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$ ) with oligoribonucleotide 5'-mesityl phosphates [ $\text{MsCO}(\text{pA})_n$ ], oligoribonucleotide 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzyl 5'-phosphamides [ $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pA})_n$ ] were prepared. Under aqueous treatment of the acylation products in the specified conditions there was virtually no oligoribonucleotide degradation, and the extent of isomerization of phosphodiester bonds was below 17%. The rate constant of the  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  phosphorylation with  $\text{MsCOpA}$  was  $5.3 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  at  $50^\circ$  in DMF. Alkylating phosphamides of  $(\text{pA})_7$  and  $(\text{pA})_8$  were shown to form the complexes with *E. coli* rRNA and DNA, in which nucleic acids were efficiently alkylated.

---