



УДК 547.963.32.07

ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫЕ АНАЛОГИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

СИНТЕЗ АМИНОГЕКСИЛОВЫХ ТРИЭФИРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ОЛИГОТИМИДИЛАТОВ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИХ
СВОЙСТВ

Данилюк И. К., Петренко В. А., Поздняков П. И.,
Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. П.

Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии
Главного управления микробиологической промышленности СМ СССР, Новосибирск

Разработан способ получения триэфирных аминоалкиловых производных олигонуклеотидов, основанный на реакции хлорфениловых эфиров олигонуклеотидов с аминоспиртами в полярных органических растворителях в присутствии CsF или фтористого тетрабутиламмония. Показана более высокая каталитическая активность последнего по сравнению с CsF в реакции переэтерификации. Обнаружена инертность аминогруппы в условиях алкоголиза. Синтезированы ω -аминогексильные триэфирные аналоги тимидилил- и пентатимидилил ($3'-5'$) тимидина. Исследовано связывание аминогексильного и этилового триэфирных аналогов гексатимидилата — $[\text{Tr}(\text{nhx})]_5\text{T}$ и $[\text{Tr}(\text{Et})]_5\text{T}$, — а также $[\text{Tr}]_5\text{T}$ с полидезоксидениловой кислотой. Показано, что комплекс, включающий в себя положительно заряженный олигонуклеотид $[\text{Tr}(\text{nhx})]_5\text{T}$, характеризуется большей термической устойчивостью по сравнению с комплексами, содержащими отрицательно заряженный $[\text{Tr}]_5\text{T}$ или нейтральный $[\text{Tr}(\text{Et})]_5\text{T}$ олигонуклеотиды.

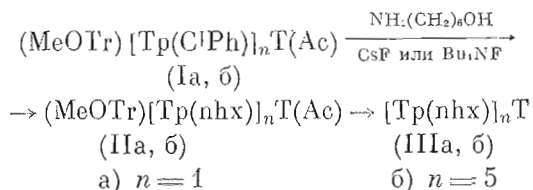
Ранее алкоголизом хлорфениловых триэфирных производных олиготимидилатов в присутствии CsF получены алкиловые триэфирные аналоги олигонуклеотидов [1, 2]. Такие производные представляют значительный интерес для молекулярно-биологических исследований [3, 4].

В настоящей работе на примере синтеза аминоалкиловых производных олиготимидилатов показана возможность использования в реакции алкоголиза соединений, несущих наряду со спиртовой первичную аминогруппу, которая остается инертной в условиях переэтерификации. Для аминогексильного спирта величина pK_a сравнима с таковой *n*-бутиламина (3, 4). В нейтральных условиях это обеспечивает почти количественное протонирование NH_2 -групп *n*-аминогексильного остатка [5]. Включение положительно заряженных аминогрупп в состав триэфирных аналогов олигонуклеотидов приводит к увеличению сродства последних к нуклеиновым кислотам. Открывается возможность использования таких аналогов в аффинной модификации нуклеиновых кислот.

Аминогексильные производные олиготимидилатов синтезировали переэтерификацией хлорфениловых эфиров последних в присутствии фтори-

nhx — 6-аминогексил.

дов цезия или тетрабутиламмония (схема).



Поскольку спиртовой компонент 6-аминогексанола-1 является кристаллическим соединением, мы модифицировали методику синтеза алкиловых триэфиров олигонуклеотидов [1], ориентируя ее на использование любых, в том числе и малодоступных, спиртов. При помощи спектроскопии ^{31}P -ЯМР было установлено, что переэтерификацию можно проводить не только в растворах реагирующих спиртов, но и в других органических растворителях, например хлороформе, тетрагидрофуране, диоксане или пиридине. При этом аминоспирт, взятый в 10–100-кратном избытке по отношению к фосфату, активно вступает в реакцию. В результате были найдены условия, позволившие синтезировать аминоксильный аналог динуклеотида (IIa) с количественным выходом. В качестве модельного соединения использовали полностью защищенный тимидил-3'→5'-тимидин (Ia). Реакцию проводили 1,5–2 ч при 35° С в абс. пиридине при соотношении фосфата (Ia), CsF и 6-аминогексанола-1 1 : 10 : 100. За ходом реакции следили с помощью спектроскопии ^{31}P -ЯМР (рис. 1) и ТСХ. Как видно из спектров, интенсивность сигналов с химическими сдвигами 7,39 и 7,69 м.д., соответствующих диастереомерам исходного динуклеозидфосфата (Ia), в ходе реакции уменьшается. В то же время накапливаются сигналы с химическими сдвигами 1,81 и 1,93 м.д., характерные для алкиловых триэфирных производных олигонуклеотидов. Удаление концевых защитных групп в соединении (IIa) проводили как описано ранее [1]. По данным электрофореза, единственным продуктом реакции является триэфир (IIIa), движущийся к отрицательно заряженному электроду. О присутствии свободной аминогруппы свидетельствует также окрашивание нингидрином.

Переэтерификация фосфатов (Ia) и (Iб) протекает в выбранных условиях медленнее, чем в случае синтеза алкиловых производных, описанных нами ранее, что объясняется ограниченной растворимостью фтористого цезия в абс. пиридине при комнатной температуре. Фторид тетрабутиламмония, рекомендованный для синтеза триалкилфосфатов из трифенилфосфатов [2], в отличие от фторида цезия хорошо растворим во многих полярных органических растворителях. Нами показано, что Bu_4NF является более активным катализатором переэтерификации хлорфениловых производных олигонуклеотидов, чем CsF. Например, замена CsF на тетрабутиламмонийфторид в реакции динуклеозидфосфата (Ia) с этанолом значительно повышает скорость образования соответствующего этилового производного. Ускорение реакции наблюдается и в случае синтеза производных (IIa) и (IIб).

Так, в спектрах ^{31}P -ЯМР реакционной смеси, содержащей динуклеозидфосфат (Ia), тетрабутиламмонийфторид и 6-аминогексанола-1 в мольном соотношении 1 : 5 : 100 в пиридине уже через 5 мин при 20° С регистрируются лишь сигналы с δ 1,81 и 1,93 м.д., соответствующие аминоксильному производному (IIa), в то время как при использовании CsF количественное образование триэфира (IIa) наблюдается через ~2 ч.

После отработки условий алкоголиза 6-аминогексанола-1 защищенного динуклеозидфосфата (Ia) мы использовали эту реакцию для синтеза аминоксильных производных гексатимидилата (IIб) и (IIIб). За ходом реакции следили с помощью спектроскопии ^{31}P -ЯМР и ТСХ. Так же как и в случае модельного соединения (Ia), количественное превращение хлорфенилового эфира (Iб) в аминоксильное производное (IIб) проходило в

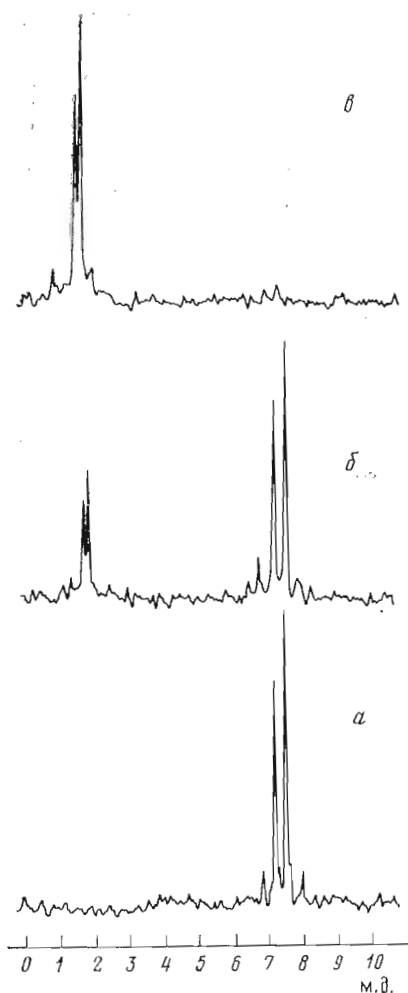


Рис. 1

Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР, записанные в ходе реакции $(\text{MeOTr})\text{Tr}(\text{ClPh})\text{T}(\text{Ac})$ (Ia) с 6-аминогексанолом-1 в присутствии CsF (1:10:10) в безводном пиридине при 35°C через 2 (a), 40 (б) и 100 мин (в)

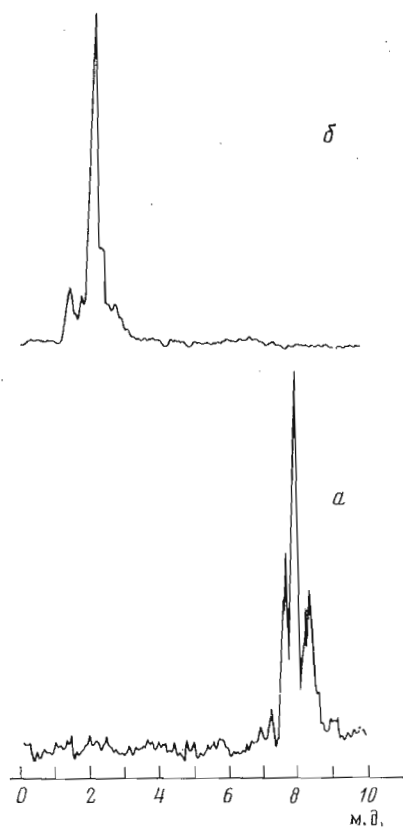


Рис. 2

Рис. 2. Спектры ^{31}P -ЯМР хлорфенилового (Iб) (a) и аминогексилового (IIIб) (б) триэфирных производных пентаимидилил(3'-5') тимидила в безводном пиридине, снятые при 35°C

присутствии фторида тетрабутиламмония за несколько минут. После удаления концевых защитных групп аминогексильный аналог гексатимидилата (IIIб) выделяли гель-фильтрацией. Данные ^{31}P -ЯМР (рис. 2б) указывают на присутствие в соединении триэфирных межнуклеотидных фосфатных звеньев. Заниженная по сравнению с соответствующими алкиловыми производными хроматографическая подвижность соединения (IIIб) указывает на присутствие в нем заряженных аминогрупп. Наличие последних подтверждается окрашиванием пятен на хроматограммах нингидрином. Структура соединения подтверждается также данными УФ- и ПМР-спектроскопии.

Для оценки комплексообразующих свойств аминогексильных аналогов олигонуклеотидов по отношению к нуклеиновым кислотам нами изучено связывание производного гексатимидилата (IIIб) с полидезоксинадениловой кислотой poly(dA). Кривые изменения усредненного коэффициента

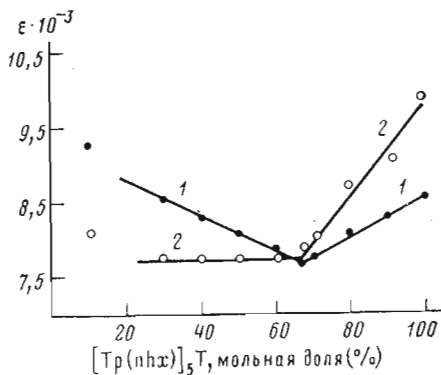


Рис. 3. Зависимость образования комплекса $[\text{Tr}(\text{nhx})]_5\text{T} \cdot \text{poly}(\text{dA})$ от мольных соотношений компонентов в смеси (2°C , $0,1\text{ M NaCl}$, $0,05\text{ M}$ фосфатный буфер, $\text{pH } 7,0$, c $0,63\text{ mM}$). Контроль: $1 - \lambda$ 260 ; $2 - \lambda$ 265 нм

женным производным гексатимидилата (IIIб), отрицательно заряженным гексатимидилатом $[\text{Tr}]_5\text{T}$ и его нейтральным триэфирным аналогом $[\text{Tr}(\text{Et})]_5\text{T}$. С этой целью нами сняты в одинаковых условиях кривые плавления для смесей этих производных с $\text{poly}(\text{dA})$ (рис. 4а – в). Различие в комплексообразующих свойствах этих олигонуклеотидов должно быть связано в основном с изменением электростатического взаимодействия с полианионом $\text{poly}(\text{dA})$. Действительно, температуры плавления комплексов в растворах с большей (1) и меньшей (2) ионной силой различаются в случае заряженных олигонуклеотидов (рис. 4а, б) и практически совпадают в случае нейтрального производного (рис. 4в). Интересной особенностью поведения положительно заряженного олигонуклеотида $[\text{Tr}(\text{nhx})]_5\text{T}$ является то, что с уменьшением ионной силы раствора прочность его комплекса с полинуклеотидом увеличивается (изменение концентрации NaCl от $0,1\text{ M}$ до 0 в $0,05\text{ M}$ фосфатном буфере увеличивает температуру плавления комплекса с 21 до 23°C – рис. 4а). Напротив, стабильность комплекса диэфирного аналога $[\text{Tr}]_5\text{T}$ с $\text{poly}(\text{dA})$ в тех же условиях уменьшается с 12 до 9°C (рис. 4б), температура плавления $[\text{Tr}(\text{Et})]_5\text{T}$ с $\text{poly}(\text{dA})$ остается постоянной, равной 10°C (рис. 4в). Взаимодействие олигонуклеотида $[\text{Tr}(\text{nhx})]_5\text{T}$ с $\text{poly}(\text{dA})$ носит специфический характер. На это указывают данные контрольного эксперимента, проведенного с использованием полидезокситимидиловой кислоты вместо $\text{poly}(\text{dA})$. В этом случае при смешивании компонентов, а также при изменении температуры смеси не наблюдалось отличия от аддитивного спектра.

Таким образом, в настоящей работе предлагается модифицированный метод синтеза триэфирных аналогов олигонуклеотидов, позволяющий использовать в реакции аминоспирты с незащищенной аминогруппой. На примере получения аминоксилового эфира гексатимидилата (IIIб) показано, что такой подход может быть использован при синтезе достаточно длинных производных олигонуклеотидов. Положительно заряженные олигонуклеотиды могут обладать важными преимуществами по сравнению как с обычными диэфирными олигонуклеотидами, так и с их нейтральными аналогами при решении задач, связанных с направленным воздействием на определенные участки нуклеиновых кислот.

Экспериментальная часть

В работе использовали полностью защищенные олиготимидилаты (Iа) и (Iб), синтезированные триэфирным методом [6], 6-аминогексанол-1 (Serva, ФРГ), полидезокситимидиловую кислоту $\text{poly}(\text{dT})$ (Sigma, США);

молярного поглощения нуклеотидов в растворах, содержащих различное относительное количество олигонуклеотида (IIIб) и $\text{poly}(\text{dA})$ (рис. 3), содержат характерные минимумы поглощения, что свидетельствует об образовании специфического комплекса. Точка перегиба кривых, снятых при различных длинах волн, приходится на мольную долю тимидилата – $0,66$. Это может служить указанием на образование трехтяжевого комплекса состава $2\text{T} \cdot \text{A}$.

Важной характеристикой комплексов олигонуклеотид – полимер является их термическая устойчивость. Интересно было сравнить в нейтральных растворах прочность комплексов, образованных полидезоксидециловой кислотой с положительно заря-

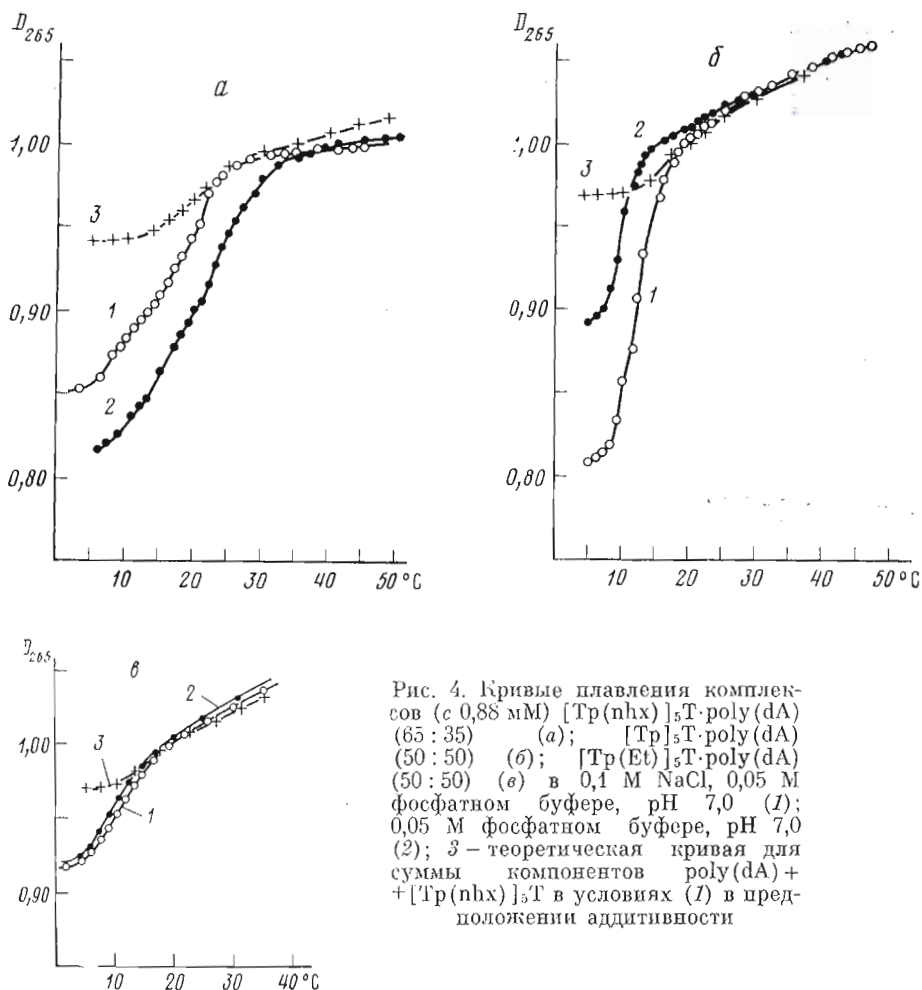


Рис. 4. Кривые плавления комплексов (с 0,88 мМ) $[\text{Tr}(\text{nhx})]_5\text{T}\cdot\text{poly}(\text{dA})$ (65 : 35) (а); $[\text{Tr}]_5\text{T}\cdot\text{poly}(\text{dA})$ (50 : 50) (б); $[\text{Tr}(\text{Et})]_5\text{T}\cdot\text{poly}(\text{dA})$ (50 : 50) (в) в 0,1 М NaCl, 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,0 (1); 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,0 (2); 3 — теоретическая кривая для суммы компонентов $\text{poly}(\text{dA}) + [\text{Tr}(\text{nhx})]_5\text{T}$ в условиях (1) в предположении аддитивности

синтез этилового триэфирного аналога $[\text{Tr}(\text{Et})]_5\text{T}$ описан ранее [1]. Полидезоксидениловая кислота $\text{poly}(\text{dA})$ ($M > 40\,000$) любезно предоставлена В. К. Старостиной (СКТВ БАВ, Новосибирск). Фтористый цезий и фтористый тетрабутиламмоний получали анионным обменом из CsCl и гидроксид тетрабутиламмония с использованием дауэкса 1×8 (F^-). Спектры ЯМР снимали на спектрометре WP-80 (Bruker-Physik AG, ФРГ); для ядер ^{31}P спектры записывали на частоте 32,40 МГц, химические сдвиги приведены относительно внешнего стандарта H_3PO_4 ; при регистрации спектров ПМР в качестве растворителя использовали дейтеропиридин. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках Kieselgel 60 F_{254} (Merck) в системе А: хлороформ — метиловый спирт, 8 : 2. Препаративную адсорбционную хроматографию проводили в системе Б: хлороформ — метиловый спирт, 8,5 : 1,5. Оптические измерения проводили на спектрофотометре «Perkin-Elmer 55», снабженном термостатируемой приставкой и терморайой. Общая концентрация нуклеотидов в растворах в расчете на остаток мононуклеотида (с) при изменении УФ-поглощения составляла 0,1–1 мМ. Растворы олиго- и полинуклеотидов готовили при 20° С, используя следующие значения максимальных молярных коэффициентов поглощения: $\text{poly}(\text{dA})$ — 8100 [7]; $\text{poly}(\text{dT})$, $[\text{Tr}]_5\text{T}$, $[\text{Tr}(\text{nhx})]_5\text{T}$ и $[\text{Tr}(\text{Et})]_5\text{T}$ — 8700. Кривые смещения и плавления получали как описано в работе [8].

(MeOTr)Tr(nhx)T(Ac) (IIa). а. К раствору 20 мг (~20 мкмоль) (MeOTr)Tr(CiPh)T(Ac) и 24 мг (~200 мкмоль) 6-аминокгексанола-1 в

1,2 мл сухого пиридина добавляли 13 мг (200 мкмоль) фтористого цезия и помещали в термостат (40° С). Через 2 ч реакционную смесь упаривали, удаляли пиридин азеотропной отгонкой с бензолом, остаток растворяли в метиловом спирте и продукт выделяли адсорбционной хроматографией на пластинках с силикагелем в системе Б. Полученное вещество гомогенно по данным ТСХ: $R_{T(AC)}$ 0,36 (система А); спектр ^{31}P -ЯМР: δ 1,81 и 1,93 м. д. Спектр ПМР, δ , м. д.: 3,58 и 6,7–7,8 (5'-MeOTr), 1,95 (3'-OAc), 1,58 и 1,88 (5-CH₃), 1,03; 2,68 и 4,00 (CH₂-группы аминокетильного остатка), 2,3–2,9 (2'-CH₂), 4,1–5,1 (4'-H и 5'-CH₂), 5,3–5,7 (3'-H) и 6,6 (1'-H) [3, 9, 10]. Соотношение интенсивностей сигналов соответствует рассчитанному.

$[Tr(nhx)]_5T$ (IIIб). К 15 мг (5 мкмоль) (MeOTr) $[Tr(ClPh)]_5T(AC)$ и 295 мг (2500 мкмоль) 6-аминогексанола-1 в 1,2 мл сухого пиридина добавляли 15 мг (60 мкмоль) Bu_4NF . Через 20 мин реакционную смесь упаривали, удаляли пиридин азеотропной отгонкой с бензолом. Остаток последовательно обрабатывали уксусной кислотой и аммиаком для полного деблокирования [1]. Продукт выделяли гель-фильтрацией на сефадексе L H-20. Выход 75 ОЕ₂₆₀ (25%). Перед снятием спектра ПМР вещество переводили в Cl⁻форму с помощью дауэкса 1×8 (Cl⁻). Спектр ПМР, δ , м. д.: 1,4; 4,2 (CH₂), 1,75 и 1,95 (5-CH₃), 2,5–3,3 (2'-CH₂), 6,25 (1'-H), 7,8 (6-H). УФ-спектр соединения при pH 7,0 ($\lambda_{мин}$ 235, $\lambda_{макс}$ 264 нм) совпадает со спектром олиготимидилатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петренко В. А., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. И. Неионные аналоги олигонуклеотидов. Синтез алкиловых триэфиров олигонуклеотидов реакцией переэтерификации.— *Биоорг. химия*, 1980, т. 6, № 3, с. 431–435.
2. Ogilvie K. K., Beaucage S. L. Fluoride ion-promoted transesterification in phosphate triesters.— *J. C. S. Chem. Commun.*, 1976, p. 443–444.
3. Miller P. S., Braiterman L. T., Ts'o P. O. P. Effects of trinucleotide ethyl phosphotriester $G^{mp}(Ee)C^{mp}(Et)U$ on mammalian cells in culture.— *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 9, p. 1988–1996.
4. Zamecnik P. C., Stephenson M. L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 1, p. 280–284.
5. Краткий справочник физико-химических величин. Под редакцией Мищенко К. П. и Равделя А. А. Л.: Химия, 1972, с. 122.
6. Stawinski J., Hozumi T., Narang S., Bahl C., Wu B. Arylsulfonyltetrazoles, new coupling reagents and further improvements in the triester method for the synthesis of deoxyribooligonucleotides.— *Nucl. Acids Res.*, 1977, v. 4, № 2, p. 353–371.
7. Pless P. C., Ts'o P. O. P. Duplex formation of a nonionic oligo(deoxythymidylate) analogue [heptadeoxythimidyl-(3'-5')-deoxythynudie heptaethyl ester (d-Tr(Et)₇T)] with poly(deoxyadenylate). Evaluation of the electrostatic interaction.— *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 6, p. 1239–1250.
8. Соколова Н. И., Каграманова В. К., Долиная Н. Г. Специфическое комплексообразование в водных растворах с участием моно- и олигонуклеотидов.— *Успехи химии*, 1975, т. 44, вып. 1, с. 104–133.
9. Cheng D. M., Sarma R. H. Intimate details of the conformational characteristics of deoxyribodinucleoside monophosphates in aqueous solution.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1977, v. 99, № 22, p. 7333–7348.
10. Вознюк Л. А., Флоренцова В. Л. Селективное удаление ацильной защитной группы в β -цианэтиловом эфире 3'-О-ацилдезокситимидиловой кислоты.— *Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 10, с. 1346–1348.

Поступила в редакцию
23.VII.1980

После доработки
11.XI.1980

POSITIVELY CHARGED ANALOGS OF OLIGONUCLEOTIDES. SYNTHESIS
OF AMINOHEXYL TRIESTER DERIVATIVES OF OLIGOTHYMYDYLATES,
AND STUDY OF THEIR COMPLEXING PROPERTIES

DANILYUK N. K., PETRENKO V. A., POZDNYAKOV P. I.,
SIVOLOBOVA G. F., SHUBINA T. N.

*All-Union Institute of Molecular Biology, Central Board for
Microbiological Industry under the Council of Ministers of the
U.S.S.R., Novosibirsk*

A method for preparing triester alkyl derivatives of oligonucleotides was suggested which is based on oligonucleotide chlorophenyl esters reaction with aminoalcohols in polar organic solvents in the presence of CsF or tetrabutylammonium fluoride (Bu_4NF). The latter compound was shown to be more potent than CsF in transesterification. Amino group was found to be inert in conditions of alcoholysis. ω -Aminoethyl triester analogs of thymidylyl- and pentathymidylyl ($3' \rightarrow 5'$) thymidine were synthesized. Binding with polydeoxyadenylic acid was studied for aminoethyl and ethyl triester analogs, $[\text{Tp}(\text{nhx})]_5\text{T}$, $[\text{Tp}(\text{Et})]_5\text{T}$, and for $[\text{Tp}]_5\text{T}$. A complex formed with positively charged oligonucleotide $[\text{Tp}(\text{nhx})]_5\text{T}$ was shown to have a higher thermostability than those involving negatively charged $[\text{Tp}]_5\text{T}$ or neutral $[\text{Tp}(\text{Et})]_5\text{T}$.