



УДК 577.113.4

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИАСТЕРЕОМЕРОВ НЕИОННЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОНУКЛЕСТИДОВ

III *. КОМПЛЕМЕНТАРНО-АДРЕСОВАННАЯ МОДИФИКАЦИЯ poly (dA)
АЛКИЛИРУЮЩИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ, СИНТЕЗИРОВАННЫМИ НА ОСНОВЕ
ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ДИАСТЕРЕОМЕРОВ ТРИЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ
ТЕТРАТИМИДИЛИЛУРИДИНА

*Абрамова Т. В., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В.,
Шичко Н. П., Федорова О. С.*

*Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

На основе четырех индивидуальных диастереомеров триэтиловых эфиров тетра-
тимидилилуридина $[Tr(Et)]_3TrU$ синтезированы алкилирующие производные вида
 $Tr(Et)Tr(Et)Tr(Et)TrU(CHRCI)$, где $CHRCI - 2',3'-O-[4-N-(2-хлорэтил)-N-метилами-$
 $но]бензилден$ остаток: $[Tr'(Et)]_3TrU(CHRCI)$ (I), $Tr'(Et)Tr''(Et)Tr'(Et) \times$
 $\times TrU(CHRCI)$ (II), $Tr''(Et)Tr'(Et)Tr''(Et)TrU(CHRCI)$ (III), $[Tr''(Et)]_3TrU(CHRCI)$
(IV). Обозначения r' и r'' соответствуют тетраэдрическим атомам фосфора, конфи-
гурации при которых по отношению друг к другу энантиомеры. Из кинетических
данных определены константы ассоциации реагентов (I) – (IV) с poly(dA): 11,6; 24,5;
76,0; 228,6 M^{-1} соответственно. Для неадресованной модификации oligo(dA) реагентом
(Me)rU(CHRCI) определен фактор конкуренции, равный 3,5 M^{-1} , что на поряд-
док ниже соответствующей величины для гуанинов в составе тРНК. Показано, что
скорость адресованной модификации реагентами (I) – (IV) превышает скорость не-
адресованной модификации в 3,3; 6,8; 20,2 и 53,6 раза соответственно.

Использование неионных аналогов олигонуклеотидов, способных про-
никать через наружную клеточную мембрану в качестве адресующих
фрагментов для комплементарно адресованных алкилирующих реагентов,
позволило впервые осуществить высокоселективное алкилирование нук-
леиновых кислот в клетке. В работах [2–5] было показано, что 2',3'-O-
[4-N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]бензилденные производные олигонук-
леотидов $[Tr(Et)]_nU$ проникают в клетки асцитной карциномы Кребс II
и ковалентно связываются с poly(A)-фрагментами с эффективностью, на
два порядка превышающей реакцию с ДНК и другими фракциями РНК.
При 5°С удалось зарегистрировать адресованную модификацию даже
реагентом с коротким адресующим фрагментом ($n=4$). В этих работах
были использованы неразделенные смеси диастереомеров, появление кото-
рых связано с хиральностью межнуклеотидных атомов фосфора. Между
тем установлено, что прочность комплексов неионных аналогов олигонук-
леотидов существенно зависит от конфигурации заместителей при атоме
фосфора [6–10]. В настоящей работе мы сопоставили количественные
характеристики алкилирования poly(dA) реагентами $[Tr(Et)]_3TrU \cdot$
 $\cdot(CHRCI)$ с определенными конфигурациями при атомах фосфора в фосфо-
триэфирных фрагментах: $[Tr'(Et)]_3TrU(CHRCI)$ (I), $Tr'(Et)Tr''(Et) \cdot$
 $\cdot Tr'(Et)TrU(CHRCI)$ (II), $Tr''(Et)Tr'(Et)Tr''(Et)TrU(CHRCI)$ (III)
и $[Tr''(Et)]_3TrU(CHRCI)$ (IV). Абсолютные конфигурации при асиммет-
рических атомах фосфора не установлены, однако ранее были соотнесены
с конфигурациями диастереомеров $Tr'(Et)T$ и $Tr''(Et)T$ [1, 11].

На первом этапе работы были синтезированы четыре индивидуальных
диастереомера $(Tr)[Tr(Et)]_3Tr(CIPh)$ [11]. Структура этих соединений
дополнительно была подтверждена методом ^{31}P -ЯМР-спектроскопии. Так,
в спектре ^{31}P -ЯМР $(Tr)[Tr'(Et)]_3Tr(CIPh)$ регистрируются два сигнала

* Сообщение II см. [1]. Сокращения: TPS-хлорид – 2,4,6-триизопропилбензол-
сульфонилхлорид, $CHRCI - 2',3'-O-[4-N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]бензилден$. Пре-
фикс «d» для тимидина всюду опущен. ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная
хроматография. Обозначения r' и r'' соответствуют фосфатным остаткам, конфи-
гурации при атомах фосфора которых энантиомеры.

при $-2,59$ и $-6,21$ м.д. с соотношением интенсивностей 3:1 в области резонанса ядер фосфора соответственно триалкил- и алкиларилэтерифицированных остатков фосфорной кислоты в полном согласии с данными работ [11–13]. Защищенные тетратимидилаты конденсировали с 2',3'-О-этоксиметиленуридином в присутствии TPS-хлорида и N-метилимидазола аналогично методу [14]. После удаления *n*-хлорфенильной, тритильной и этоксиметилдищевой защитных групп использованные четыре диастереомера пентануклеотида были выделены методом обращенно-фазовой хроматографии. По данным микроколоночной понообменной хроматографии, все пентануклеотиды были гомогенны, их хроматографические подвижности соответствовали соединению с зарядом -1 . Структура полученных производных была подтверждена методом $^1\text{H-NMR}$. Соотношение T-U-этил=4:1:3 находится в полном соответствии со структурой $[\text{Tr}(\text{Et})_3\text{TrU}$ (табл. 1). Отнесение сигналов в спектре было осуществлено на основании работ [11, 15, 16], а также с помощью метода двойного резонанса.

Реагенты (I)–(IV) получены исходя из пентануклеотидов $[\text{Tr}(\text{Et})_3\text{TrU}$ по методу [17] реакцией с ^{14}C -меченным по альдегидной группе [4-N-(2-хлорэтил)-N-метиламино] безальдегидом. По методу синтеза реагенты (I)–(IV) могут получаться каждый в виде пары диастереомеров в связи с наличием хирального ацетального атома углерода [18]. Можно ожидать, что соотношение полученных диастереомеров примерно одинаково для каждого из реагентов (I)–(IV). Следовательно, различие в реакционной способности полученных реагентов будет определяться только конфигурацией заместителей при асимметрических атомах фосфора.

Согласно литературным данным [7, 10], сродство неионных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов значительно выше к полидезоксирибонуклеотидам, чем к полирибонуклеотидам. В этой связи эксперименты по комплементарно-адресованной модификации проводили с poly(dA). Для повышения растворимости $[\text{Tr}(\text{Et})_3\text{TrU}(\text{CHRCI})$ в реакцию смесь добавляли диметилсульфоксид (5% по объему). Аналогичный прием был использован в работах [4, 19].

Поскольку реагенты (I)–(IV) имеют адресующий фрагмент небольшого размера и, следовательно, комплексы их с poly(dA) должны быть мало устойчивы, алкилирование poly(dA) этими реагентами исследовалось при 5°C . Степень алкилирования по ходу реакции определяли, измеряя радиоактивность в пике poly(dA) после гель-хроматографии пробы

Таблица 1

Значения химических сдвигов и некоторых констант спин-спинового взаимодействия в спектрах $^1\text{H-NMR}$ для $[\text{Tr}'(\text{Et})_3\text{TrU}$ (концентрация $2,2 \cdot 10^{-3}$ М) в D_2O (рН 5,4) в присутствии $0,8 \cdot 10^{-4}$ М EDTA

Протон ^{1*}	δ , м.д. ^{2*}	J, Гц
CH_3 (T ₁ — T ₄)	1,889(12)	-
H-6 (T ₁ — T ₄)	7,631 (1); 7,503 (1); 7,488 (1); 7,304 (1)	-
H-6 (U)	7,877 (1)	7,9
H-5 (U)	5,920 (1)	-
H-1' (T ₁ — T ₄)	6,22 ^{3*} (4)	-
H-1' (U)	5,944 (1)	3,6
H-3' (T ₁ — T ₃) ^{2*}	5,12 ^{3*} (3)	-
H-4' (T ₃ — T ₃); H-5'1 и H-5'2 (T ₂ — T ₁); H-2', H-3', H-4', H-5'1 и H-5'2 (U)	4,1—4,5(15)	-
H-5'1 и H-5'2 (T ₁)	3,788 (2)	-
CH_2 (этил)	4,23 (6)	-
CH_3 (этил)	1,361 (9)	7,0
H-2'1 и H-2'2 (T ₁ — T ₄)	2,33—2,79 (8)	-

^{1*} Нижние индексы при обозначениях остатков тимидина указывают на положение остатка в олигонуклеотидной цепи.

^{2*} В скобках приведено число протонов.

^{3*} Приведено значение химического сдвига центра мультиплета.

^{4*} Согласно работе [15], H-3' остатка T₄ должен иметь химический сдвиг 4,8 м.д., эта область закрыта сигналом HOD.

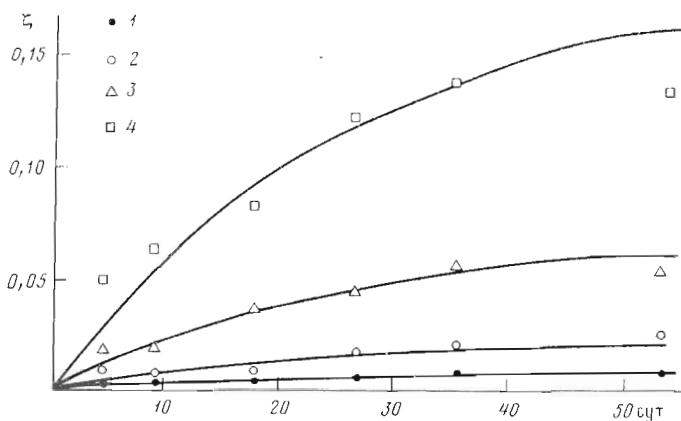


Рис. 1. Скорость расходования реагентов (I)–(IV) (I–IV соответственно) на алкилирование poly(dA) при 5° С. Концентрации реагентов и poly(dA) указаны в табл. 2. Точки соответствуют экспериментальным данным, сплошные линии – теоретическим кинетическим кривым в предположении, что скорость реакции алкилирования определяется скоростью образования этилениммониевого катиона (константа скорости $4,4 \cdot 10^{-7} \text{ с}^{-1}$)

на сефадексе G-75 при 40° С. Для повышения доли реагента, пошедшей на алкилирование, процесс проводили с избытком poly(dA). Данные по кинетике алкилирования (рис. 1) свидетельствуют, что скорости алкилирования разными диастереомерами существенно различаются.

В настоящей работе количественную обработку данных проводили, исходя из упрощенной схемы процесса



где P – poly(dA), X – реагент, PX – комплекс полимера с реагентом, PZ – продукт алкилирования, R – продукт гидролиза реагента, K_X – константа ассоциации P с X, k_0 – константа скорости лимитирующей стадии превращения X, которая представляет собой образование промежуточного этилениммониевого катиона (I). Как следует из данных работы [20], k_0 приблизительно одинакова для реакции в водном растворе и в составе комплекса с полинуклеотидами. Главное упрощение по сравнению с полной схемой процесса, приведенной в работе [21], состоит в допущении, что образующийся в составе комплекса промежуточный этилениммониевый катион полностью расходуется в реакции внутрикомплексного алкилирования. Оценки, проведенные в работе [22] по алкилированию рибосомной РНК реагентом $(\text{Ar})_5\text{A}(\text{CH}_2\text{Cl})$, свидетельствуют в пользу этого предположения – на алкилирование рРНК в условиях ее избытка расходуется свыше 90% образующегося этилениммониевого катиона. Предполагается также, что образующиеся в растворе катионы практически полностью гидролизуются. Поскольку в описываемых экспериментах poly(dA) находится в избытке, можно не учитывать комплексообразование poly(dA) с продуктом гидролиза R, который имеет тот же олигонуклеотидный адрес и должен обладать средством к poly(dA) того же порядка, что и исходный реагент.

Нетрудно показать, что кинетика реакции, протекающей по схеме (1) в случае, если полная концентрация полимера P_t существенно выше начальной концентрации реагента x_0 , описывается уравнением

$$\xi = \frac{[\text{PZ}]}{x_0} = \frac{K_X P_t}{1 + K_X P_t} (1 - e^{-k_0 t}) \quad (2)$$

В дальнейшем под величиной P_t будет пониматься молярная концентрация потенциальных точек алкилирования, т. е. всех аденилатных остатков. В условиях наших экспериментов это справедливо, так как poly(dA)

находится в избытке, а сродство реагента к poly(dA) достаточно низкое, т. е. молекулы реагента связываются независимо друг от друга. Величина $K_X P_t / (1 + K_X P_t)$ является предельным по времени значением ξ и далее обозначена как ξ_∞ .

В работе [23] показано, что константы скоростей ионизации 2',3'-O-[4-N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]бензилиденовых производных моно- и олигонуклеотидов практически не зависят от природы нуклеотидного фрагмента. В связи с этим мы воспользовались значением k_0 , полученным из данных работы [24], равным $4,4 \cdot 10^{-7} \text{ с}^{-1}$, и из экспериментальных данных (рис. 1) нашли значение $K_X P_t$. Сплошные линии на рис. 1 проведены по уравнению (2) с использованием этих значений K_X и k_0 . Значения K_X и ξ_∞ , полученные из данных по кинетике алкилирования poly(dA) реагентами (I)–(IV), приведены в табл. 2.

Резкая зависимость скорости алкилирования и предельной степени расходования реагента на внутриклеточную реакцию от природы адресующего фрагмента показывает, что по крайней мере в случае реагентов (III) и (IV) мы имеем дело с комплементарно-адресованной модификацией. Чтобы сопоставить наблюдаемую кинетику алкилирования с кинетикой неадресованной реакции, мы исследовали алкилирование олигонуклеотидов реагентом (Me)pU(CHRCI). Образующийся из последнего в лимитирующей стадии этилениммониевый катион в основном расходуется в реакции гидролиза (удельная скорость a) и в реакции алкилирования олигоаденилатов (константа скорости k). Из данных по кинетике алкилирования можно найти фактор конкуренции $p = k/a$ по уравнению [25]:

$$p = \frac{\ln \{P_t / (P_t - [PZ])\}}{x_0 [1 - \exp(-k_0 t)] - [PZ]} \quad (3)$$

(обозначения те же, что и в случае адресованной реакции).

Эксперименты проводились с (pdA)₆ и (pdA)₁₄ при избытке матрицы (см. подпись к рис. 2). Чтобы избежать многодневных экспериментов, величину p определяли при 20 и 37° С, поскольку известно, что для реагентов рассматриваемого типа p мало зависит от температуры [26]. На алкилирование олигоаденилатов расходуется малая часть реагента и поэтому величиной $[PZ]$ по сравнению с $x_0 [1 - \exp(-k_0 t)]$ можно пренебречь. Из рис. 2 видно, что данные для обоих аденилатов при 20 и 37° С в пределах точности эксперимента укладываются на одну прямую, соответствующую $p = 3,5 \text{ M}^{-1}$. Ранее величина p для отдельных остатков гуанина в составе валлиновой тРНК из дрожжей и фецилаганиновой тРНК из *E. coli* была найдена равной, в зависимости от условий алкилирования, порядка 20–50 M^{-1} [27–29]. В значительной мере это расхождение связано с тем, что реакционная способность остатков гуанина в составе тРНК существенно превосходит таковую для остатков аденина [30]. Величина p позволяет рассчитать скорость неадресованной реакции в тех же условиях, в которых проводилось адресованное алкилирование, и тем самым сопоставить скорости адресованного и неадресованного (индексы «ад» и «неад» соответственно) алкилирования. В общем виде скорость адресованного алкилирования

$$v_{\text{ад}} = k_0 [PX] = \frac{k_0 K_X P_t x}{1 + K_X P_t} = k_0 \xi_\infty x,$$

Таблица 2

Значения кинетических параметров реакции алкилирования poly(dA) реагентами (I)–(IV) ($P_t = 960 \text{ мкМ}$) (в расчете на мононуклеотид)

Реагент	Концентрация реагента, мкМ	$\xi_\infty \cdot 10^2$	$K_X, \text{ M}^{-1}$	f
(I)	57	1,1	11,6	3,3
(II)	50	2,3	24,5	6,8
(III)	47	6,8	76,0	20,2
(IV)	39	18,0	228,6	53,6

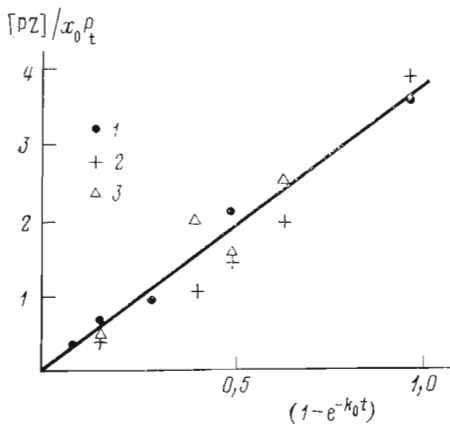


Рис. 2. Зависимость $[PZ]/x_0 P_t$ от $1 - e^{-k_0 t}$ (см. уравнение 3) при алкилировании $(pdA)_6$ и $(pdA)_{14}$ реагентом $(Me)pU \cdot (CH_2Cl)_2$. Точки 1 соответствуют $[(pdA)_6] = 1,1 \cdot 10^{-2} M$, $37^\circ C$; 2 — $[(pdA)_6] = 1,3 \cdot 10^{-2} M$, $20^\circ C$; 3 — $[(pdA)_{14}] = 0,7 \cdot 10^{-2} M$, $20^\circ C$. Концентрация реагента $2,2 \cdot 10^{-3} M$

а скорость неадресованной реакции по уравнению (3) равна

$$v_{\text{неад}} = k [I] x = \frac{k_0 k P_t x}{k P_t + a} = k_0 \frac{p P_t}{1 + p P_t} x,$$

т. е.

$$f = \frac{v_{\text{ад}}}{v_{\text{неад}}} = \frac{1 + p P_t}{p P_t} \zeta_{\infty}. \quad (4)$$

Соответствующие величины для всех четырех реагентов, рассчитанные из экспериментальных данных по уравнению (4), приведены в последней графе табл. 2. Видно, что во всех рассмотренных случаях преобладает адресованное алкилирование, причем именно конфигурация p'' благоприятствует образованию комплекса реагентов с $\text{poly}(dA)$. Можно полагать, что в случае более длинных адресованных олигонуклеотидов роль конфигурации при этерифицированном фосфате должна возрастать и использование гидрофобных адресованных реагентов с должным образом выбранной конфигурацией может существенно повысить их эффективность и селективность в комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот.

Экспериментальная часть

В работе использовали TPS-хлорид (ОХП НИОХ СО АН СССР), $(Me)pU$ (ОХП НИОХ СО АН СССР), $\text{poly}(dA)$ (НИКТИ БАВ, г. Бердск), уридин (Reanal, Венгрия), N-метилимидазол (Serva, ФРГ), абс. пиридин, диметилформамид, диэтиловый эфир. $\text{Poly}(dA)$ перед использованием в экспериментах хроматографировали на сефадексе G-100 (Pharmacia, Швеция), собирая узкую зону высокополимерного материала. $(pdA)_6$ и $(pdA)_{14}$ были любезно предоставлены А. С. Левиной и В. В. Горном. Хроматографию проводили на силикагеле L40/100 (Chemaroi, ЧССР), на целлюлозе DE-52 (Whatman, Англия); хроматографию в микромасштабе — на целлюлозе DE-52 и на Partisil 10SAX (Whatman, Англия); обращенно-фазовую хроматографию — на Lichrosorb 5RP18, 10RP18 и Lichroprep 30 RP18 (Merck, ФРГ). При проведении ВЭЖХ использовали хроматографы «Миллхром» (г. Орел) [31] и Altex (Altex, США). ТСХ осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ).

Спектры 1H -ЯМР записывали на спектрометре WP-200 (Bruker, ФРГ) в D_2O при $30^\circ C$. В качестве внутреннего стандарта использовали натриевую соль 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфокислоты. Спектр ^{31}P -ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 (Bruker, ФРГ) в условиях подавления гетероядерного спин-спинового взаимодействия 1H - ^{31}P . Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно $85\% H_2PO_4$ при $30^\circ C$. Для сигналов, лежащих в более сильном поле, чем сигнал H_2PO_4 , приняты отрицательные значения химических сдвигов. $(Tr)[Tr'(Et)]_3 \cdot Tr(ClPh)$, $(Tr)Tr'(Et)Tr''(Et)Tr'(Et)Tr(ClPh)$, $(Tr)Tr''(Et)Tr'(Et) \cdot Tr''(Et)Tr(ClPh)$ и $(Tr)[Tr''(Et)]_3Tr(ClPh)$ получали, как описано ра-

нее [1, 11]. 2',3'-О-Этоксиметиллиденуридин получали по методу [32], $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}_6\text{H}_4-[^{14}\text{C}]\text{HO}$ получали по методу [25].

$(\text{Tr})[\text{Tp}'(\text{Et})]_3\text{Tp}(\text{ClPh})\text{U}[\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)]$. 2,5 мкмоль $(\text{Tr})[\text{Tp}'(\text{Et})]_3\text{Tp}(\text{ClPh})$, полученного по методу [11], обессолили методом гель-хроматографии на колонке (1,5×55 см) с сефадексом LH-20 (Pharmacia, Швеция) в метаноле, а затем дополнительно очистили хроматографией на силикагеле (колонка 1×25 см) в системе хлороформ — метанол — триэтиламин (9:1:0,1). Фракции, соответствующие триэтиламиниевой соли триэтилового эфира тетратимидилата, упарили несколько раз с абс. пиридином, растворили в 50 мкл абс. пиридина и осадили 1 мл гексана. Осадок отделили центрифугированием, высушили в вакууме над P_2O_5 в течение суток. Конденсацию $(\text{Tr})[\text{Tp}'(\text{Et})]_3\text{Tp}(\text{ClPh})$ и $\text{U}[\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)]$ проводили в присутствии TPS-хлорида и N-метилимидазола аналогично работе [14], но в качестве растворителя использовали абс. пиридин. Продукты конденсации выделяли на колонке с силикагелем (1×25 см) в системе хлороформ — метанол (95:5). Аналогично получали $(\text{Tr})\text{Tp}'(\text{Et})\cdot\text{Tp}''(\text{Et})\text{Tp}'(\text{Et})\text{Tp}(\text{ClPh})\text{U}[\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)]$, $(\text{Tr})\text{Tp}''(\text{Et})\text{Tp}'(\text{Et})\text{Tp}''(\text{Et})\cdot\text{Tp}(\text{ClPh})\text{U}[\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)]$ и $(\text{Tr})[\text{Tp}''(\text{Et})]_3\text{Tp}(\text{ClPh})\text{U}[\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)]$. Выход тетратимидилилуридинов определяли после удаления защитных групп.

$[\text{Tp}'(\text{Et})]_3\text{TpU}$. 60 ОЕ₂₆₆ $(\text{Tr})[\text{Tp}'(\text{Et})]_3\text{Tp}(\text{ClPh})\text{U}[\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)]$ обработали 2 мл конц. водного аммиака (3 ч, 50°С), затем упарили, растворили в 1 мл 80% водной уксусной кислоты и выдержали 15 мин при 120°С. При обработке кислотой одновременно с тригильной удаляется этоксиметиллиденная защитная группа. Смесь упарили и выделили продукт методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом LH-20 (0,5×20 см) в метаноле, затем методом ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 (колонка 4,6×60 мм), используя линейный градиент концентрации бикарбоната аммония (от 0 до 0,2 М) в 30% водном метаноле. Объем градиента 30 мл, скорость элюции 7 мл/ч. Фракции анализировали методом микроколоночной хроматографии [31] на целлюлозе DE-52 (градиент концентрации фосфатного буфера от 0,002 до 0,06 М в 6 М мочевины, pH 7,2). Фракции, соответствующие веществу с зарядом -1, объединили, упарили и нанесли на колонку (1×15 см) со смолой Lichrospher 30RP18. Элюцию проводили, используя линейный градиент концентрации метанола в воде от 0 до 100%, содержащий 0,05 М триэтиламинийацетат, pH 6,5. Объем градиента 0,5 л. Фракции, содержащие основное вещество, объединили и анализировали методом микроколоночной хроматографии на колонке (2×62 мм) со смолой Lichrosorb 5RP18 в 50% водном метаноле. По результатам анализа продукт был гомогенен. Коэффициент молярного поглощения триэтилового эфира тетратимидилилуридина принимали равным $44,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, как в работе [17]. Данные анализа методом ¹H-ЯМР приведены в табл. 1. Получили 0,9 мкмоль $[\text{Tp}'(\text{Et})]_3\text{TpU}$. Аналогично были получены 0,22 мкмоль $\text{Tp}'(\text{Et})\text{Tp}''(\text{Et})\text{Tp}'(\text{Et})\text{TpU}$, 0,18 мкмоль $\text{Tp}''(\text{Et})\text{Tp}'(\text{Et})\text{Tp}''(\text{Et})\text{TpU}$ и 0,56 мкмоль $[\text{Tp}''(\text{Et})]_3\text{TpU}$. Подвижности всех полученных триэтиловых эфиров тетратимидилилуридина совпадали при анализе методом ионообменной микроколоночной хроматографии на целлюлозе DE-52 (градиент концентрации фосфатного буфера, pH 7,2, в 6 М мочевины).

¹⁴C-Меченье $[\text{Tp}'(\text{Et})]_3\text{TpU}(\text{CHRCI})(\text{I})$, $\text{Tp}'(\text{Et})\text{Tp}''(\text{Et})\text{Tp}'(\text{Et})\text{TpU} \cdot (\text{CHRCI})(\text{II})$, $\text{Tp}''(\text{Et})\text{Tp}'(\text{Et})\text{Tp}''(\text{Et})\text{TpU}(\text{CHRCI})(\text{III})$ и $[\text{Tp}''(\text{Et})]_3\text{TpU}(\text{CHRCI})(\text{IV})$ синтезировали по методу [17]. Выход продуктов определяли после гидролиза бензилиденовой связи при pH 2,2 и температуре 20°С [33] по соотношению оптической плотности при 260 и 350 нм, используя коэффициенты молярного поглощения бензилиденowego производного пентауклеотида и свободного бензальдегида $\epsilon_{260} 63 \cdot 10^3$ и $\epsilon_{350} 28,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ согласно работам [17, 25]. Препараты реагентов (I) — (IV) были получены с выходами 75, 91, 85 и 68% соответственно. Удельная радиоактивность реагентов (I) — (IV) была равна 8,5 Ки/моль.

$(\text{Me})\text{pU}(\text{CHRCI})$ синтезировали по методу [34] из $(\text{Me})\text{pU}$ и $\text{ClCH}_2\cdot\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}_6\text{H}_4-[^{14}\text{C}]\text{HO}$. По данным обращенно-фазовой ВЭЖХ, по-

лученный препарат имел 95% чистоту. Удельная радиоактивность составляла 4,2 Ки/моль.

Алкилирование *poly(dA)* реагентами (I)–(IV) проводили в буфере, содержащем 0,2 М NaCl, 0,01 М MgCl₂, 0,01 М трис-HCl (pH 7,4) в смеси вода – диметилсульфоксид (95 : 5) при 5°С. Концентрация *poly(dA)* – 0,19 и 0,96 мМ в расчете на мононуклеотид, концентрация реагентов – 25, 50 и 120 мкМ. Коэффициент молярного поглощения *poly(dA)* принимали равным 9100 М⁻¹·см⁻¹ на одно нуклеотидное звено согласно работе [35]. Перед использованием реагентов в реакции алкилирования *poly(dA)* проводили их очистку на колонке (2×62 мм) со смолой Lichrosorb 5RP18 в 50% водном метаноле, содержащем 0,05 М триэтиламмонийацетат, pH 7,6 (хроматограф «Милихром»). Скорость элюции 6 мл/ч. Продолжительность хроматографии составляла 15 мин при 20°С. Согласно работе [24], за это время не более 0,5% реагента может превратиться в реакционноспособную форму. Сразу после хроматографии раствор реагента лиофилизовали, остаток растворяли в расчетном количестве диметилсульфоксида и к полученному раствору добавляли остальные компоненты, необходимые для проведения реакции алкилирования. Через определенные промежутки времени (см. рис. 1) из реакционной смеси отбирали аликвоты и отделяли *poly(dA)* от реагентов и продуктов их превращения методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-75 при 40°С в 0,01 М трис-HCl-буфере, pH 7,4. Степень модификации рассчитывали по отношению радиоактивности в пике *poly(dA)* к общей радиоактивности в пробе. По данным работы [36], апуринизация остатков алкилированной адениловой кислоты в условиях модификации составляет не более 10%.

Алкилирование *(pdA)₆* и *(pdA)₁₄* реагентом (Me)pU(CH₂Cl) проводили в таком же буфере, как в опытах по алкилированию *poly(dA)* реагентами (I)–(IV), за исключением добавления диметилсульфоксида, при 20 и 37°С. Коэффициент молярного поглощения олигодезоксиаденилатов принимали равным 11,5·10³ М⁻¹·см⁻¹ при 260 нм в расчете на мононуклеотид [37]. Перед использованием в реакции алкилирования реагент очищали на колонке (2×62 мм) со смолой Lichrosorb 5RP18 (градиент концентрации ацетонитрила от 0 до 100% в 0,05 М триэтиламмонийацетатном буфере, pH 7,6). Продолжительность хроматографии – не более 15 мин. Сразу же после хроматографии раствор реагента лиофилизовали, остаток растворяли в расчетном количестве буферного раствора (см. выше), содержащего *oligo(dA)*. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали аликвоты, разбавляли в 80 раз 0,001 М буфером трис-HCl (pH 7,4) и анализировали методом ионообменной микроколоночной хроматографии на колонке (2×70 мм) со смолой Partisil 10SAX (градиент концентрации фосфатного буфера, pH 6,5). Степень модификации определяли по отношению радиоактивности, связанной с пиком олигодезоксиаденилата, к общей радиоактивности в пробе.

Авторы выражают благодарность С. И. Ястребову за помощь при разделении смесей диастереомеров (Tr)Tr'(Et)Tr(Et)Tr'(Et)Tr(ClPh) и (Tr)Tr''(Et)Tr(Et)Tr''(Et)Tr(ClPh).

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Т. В., Комарова Н. И., Лебедев А. В., Тагай С. А. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 10, с. 1366–1370.
2. Карпова Г. С., Knorre D. G., Ryle A. S., Stephanovich L. E. FEBS Lett., 1980, v. 122, № 1, p. 21–24.
3. Зарытова В. Ф., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Попова В. С., Стефанович Л. Е., Шешегова Е. А. Докл. АН СССР, 1980, т. 255, № 1, с. 110–113.
4. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. И., Райт А. С., Стефанович Л. Е. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1512–1522.
5. Власов В. В., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. И., Райт А. С. Докл. АН СССР, 1984, т. 274, № 4, с. 965–968.
6. Miller P. S., Fang K. N., Kondo N. S., Ts'o P. O. P. J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 24, p. 6657–6665.
7. Pless R. C., Ts'o P. O. P. Biochemistry, 1977, v. 16, № 6, p. 1239–1250.
8. Miller P. S., Annan N. D., McParland K. B., Pulford M. Biochemistry, 1982, v. 21, № 10, p. 2507–2512.
9. Карпова Г. Г., Козлова Л. О., Пичко Н. И. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук, 1983, вып. 3, № 7, с. 96–100.

10. Miller P. S., Dreon N., Pulford M., McParland K. B. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 20, p. 9659-9665.
11. Абрамова Т. В., Лебедев А. В. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 824-831.
12. Лебедев А. В., Резвукин А. И. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 2, с. 149-185.
13. Lebedev A. V., Rezvukhin A. I. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 14, p. 5547-5566.
14. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 516-521.
15. Wood D. J., Pruska F. E., Ogilvie K. K. Can. J. Chem., 1974, v. 52, № 19, p. 3353-3366.
16. Lee C.-H., Ezra F. S., Kondo N. S., Sarma R. H., Danyluk S. S. Biochemistry, 1976, v. 15, № 15, p. 3627-3631.
17. Зарытова В. Ф., Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Шешегова Е. А. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 534-541.
18. Беликова А. М., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кабашева Г. Н., Кнорре Д. Г. Докл. АН СССР, 1970, т. 195, № 6, с. 1337-1340.
19. Barret J. C., Miller P. S., Ts' O P. O. P. Biochemistry, 1974, v. 13, № 24, p. 4897-4906.
20. Бенимецкая Л. З., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Чумитова Т. А. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 7, с. 903-913.
21. Кнорре Д. Г., Чумитова Т. А. Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 4, с. 814-821.
22. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Молекулярн. биология, 1974, т. 8, вып. 6, с. 832-844.
23. Власов В. В., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Молекулярн. биология, 1970, т. 4, № 2, с. 201-203.
24. Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук, 1969, т. 2, вып. 1, с. 104-109.
25. Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. Молекулярн. биология, 1969, т. 3, вып. 2, с. 210-219.
26. Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Сенженко Л. П., Теплова Н. М. Молекулярн. биология, 1970, т. 4, вып. 3, с. 307-312.
27. Vlassov V. V., Grineva N. I., Knorre D. G., Pavlova R. M. FEBS Lett., 1972, v. 28, № 3, p. 322-324.
28. Власов В. В., Кнорре Д. Г. Молекулярн. биология, 1974, т. 8, № 2, с. 234-243.
29. Власов В. В., Скобелыцина Л. М. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 550-561.
30. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Биоорг. химия, 1975, т. 1, № 5, с. 588-597.
31. Varat G. I., Grachev M. A., Komarova N. I., Perelroyzen M. P., Volynov Yu. A., Kuzmin S. V., Korgaltsev V. V., Kuper E. A. J. Chrom., 1983, v. 264, № 1, p. 69-90.
32. Holý A., Smrč J. Collect. Czech. Commun. Chem. Commun., 1966, v. 31, № 9, p. 3800-3816.
33. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук, 1970, вып. 2, № 4, с. 111-118.
34. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Журн. общ. химии, 1970, т. 40, вып. 1, с. 215-222.
35. Miller P. S., Chandrasegaran S., Dow D. L., Pulford S. M., Kan L. S. Biochemistry, 1982, v. 21, № 22, p. 5468-5474.
36. Бенимецкая Л. З., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1372-1380.
37. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3-rd ed./Ed. Fasman G. D. N. Y.: CRC Press, Inc., 1975, Nucl. Acids, v. 1, p. 405, 597, 589.

Поступила в редакцию
8.IV.1985

**INVESTIGATION OF DIASTEREOMERS OF NON-IONIC OLIGONUCLEOTIDE
ANALOGUES. III. COMPLEMENTARY ADRESSED MODIFICATION OF POLY (dA)
BY ALKYLATING DERIVATIVES SYNTHESIZED FROM INDIVIDUAL
DIASTEREOMERS OF TRIETHYL PHOSPHOTRIESTERS OF
TETRATHYMIDYLYLURIDINE**

ABRAMOVA T. V., KNORRE D. G., LEBEDEV A. V.,
ПИЧКО Н. П., ФЕДОРОВА О. С.

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

Alkylating derivatives [Tp(Et)]₃TpU(CHRCI) have been synthesized starting from four individual diastereomers of triethyl phosphotriester of tetrathymidylyluridine [Tp(Et)]₃TpU and 4-N-(2-chloroethyl)-N-methylaminobenzaldehyde: reagent I - [Tp'(Et)]₃TpU(CHRCI), reagent II - Tp'(Et)Tp''(Et)Tp'(Et)TpU(CHRCI), reagent III - Tp''(Et)Tp'(Et)Tp''(Et)TpU(CHRCI), reagent IV - [Tp''(Et)]₃TpU(CHRCI). Designations p' and p'' correspond to tetrahedral phosphorus atoms with enantiomeric configurations. Association constants for reagents (I)-(IV) and poly(dA) (11,6; 24,5; 76,0; 228,6 M⁻¹, resp.) were determined from kinetics data. Competition factor for non-addressed modification of oligo(dA) with the alkylating derivative of methyl ester of uridine-5'-phosphate MetpU(CHRCI) was found to be 3.5 M⁻¹. The rate of the addressed modification by reagents (I)-(IV) exceeds the rate of the non-addressed modification by 3,3; 6,8; 20,2 and 53,6 times, respectively.