



УДК 577.413.6 : 547.262'118

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭТИЛДИХЛОРФОСФИТА В СИНТЕЗЕ АЛКИЛИРУЮЩИХ ФОСФАМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НЕИОННЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

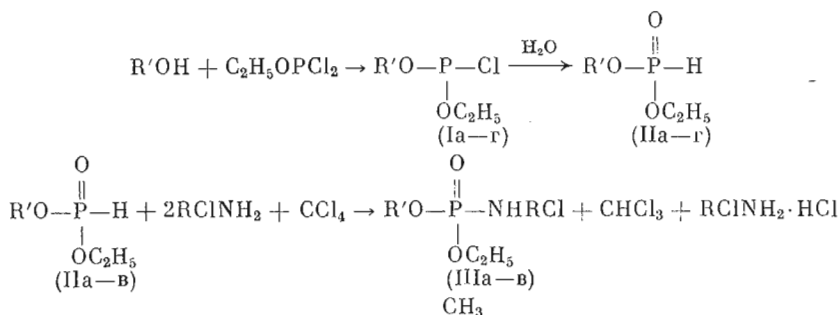
*Левина А. С., Иванова Е. М.*

*Новосибирский институт органической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Показано, что для получения алкилирующих производных олигонуклеотидов, этерифицированных по межнуклеотидным фосфатным группам, можно использовать метод, состоящий из двух последовательных стадий: 1) фосфорилирование концевой оксигруппы олигонуклеотида этилдихлорфосфитом с последующим гидролизом образующегося олигонуклеотидэтилхлорфосфита; 2) реакция полученного гидрофосфорильного производного олигонуклеотида с 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламином в присутствии  $CCl_4$ . Метод позволяет получать как 3'-, так и 5'-производные олигонуклеотидов с высоким выходом. Синтезированы алкилирующие производные двух олигонуклеотидов, этилированных по межнуклеотидным фосфатным остаткам:  $RCIN\dot{p}(Tr)_7T(Lev)$  и  $(C_6H_5NH)_2\dot{p}Tr\dot{p}G\dot{p}C\dot{p}Tr\dot{p}C\dot{p}Tr\dot{p}G\dot{p}G\dot{p}Tr\dot{p}Tr\dot{p}NHRCI$ .

В последнее время для направленного воздействия на генетический материал живых клеток стали использоваться алкилирующие производные ионных аналогов олигонуклеотидов [1, 2]. Описано применение лишь 3'-бензилиденовых производных, получение которых требует наличия рибонуклеотида на 3'-конце олигонуклеотидной цепи. Алкилирующую группировку можно вводить в олигонуклеотид также через фосфамидную связь [3], однако для этого необходимо иметь незащищенную фосфатную группу на одном из концов олигонуклеотида. В том случае, если олигонуклеотид не содержит концевой фосфатной группы, для получения фосфамидных производных необходимо фосфорилирование олигонуклеотида.

В настоящей работе описан удобный метод введения алкилирующей группировки в этерифицированный олигонуклеотид через фосфамидную связь, состоящий из двух последовательных стадий: образования 3'- или 5'-гидрофосфорильного производного олигонуклеотида с помощью этилдихлорфосфита и реакции полученного соединения с 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламином в присутствии  $CCl_4$ . Последовательность реакций приведена на схеме:



а)  $R' = (Tr)T-$

б)  $R' = -(Tr)_7T(Lev)$ ,  $R = -H_2C-C_6H_4 \cdot N$

в)  $R' = (C_6H_5NH)_2\dot{p}Tr\dot{p}G\dot{p}C\dot{p}Tr\dot{p}C\dot{p}Tr\dot{p}G\dot{p}G\dot{p}Tr\dot{p}Tr\dot{p}NHRCI$

г)  $R' = [(MeO)_2Tr]C$

Сокращения:  $RCINH_2$  - 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламин, Lev - левулинил; символом  $\dot{p}$  обозначен этилфосфат; символ d для обозначения дезоксирибонуклеотидов опущен.

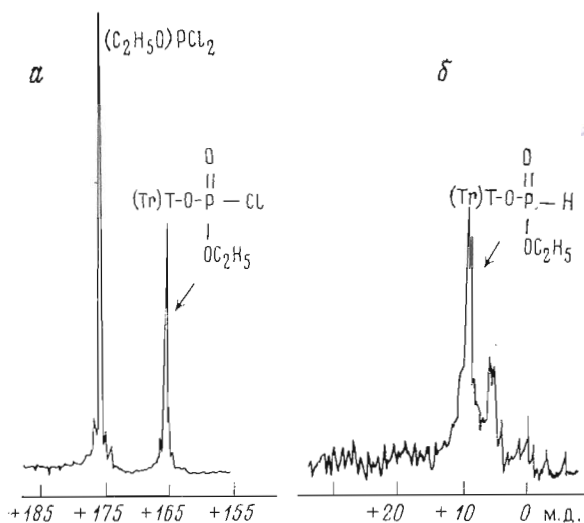


Рис. 1. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР реакционной смеси, полученной при взаимодействии 0,1 М (Tr)Т с  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OPCl}_2$  (1:3, моль/моль) в пиридине (а) и той же реакционной смеси после добавления воды (предварительно из реакционной смеси частично удален избыток  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OPCl}_2$  упариванием) (б)

Метод разрабатывался на примере (Tr)Т; отдельные стадии синтеза исследовали методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР.

При действии избытка этилдихлорфосфита на (Tr)Т в пиридине\* образуется нуклеозидэтилхлорфосфит (Ia) ( $\delta +165,5$  м.д., рис. 1а; значенные химического сдвига согласуются с литературными данными [4]). При добавлении воды в реакционную смесь в спектре наблюдается мгновенное исчезновение сигналов, соответствующих соединению (Ia) и этилдихлорфосфиту, и появление сигналов в области от +10 до 0 м.д. (рис. 1б). Такое смещение сигналов, очевидно, связано с образованием соединений, содержащих гидрофосфорильную группу  $\text{P}(\text{O})\text{H}$  [5].

При подавлении спин-спинового взаимодействия  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР соединения (IIa) в пиридине удается зарегистрировать два синглета с химическими сдвигами +6,38 и +6,52 м.д., соответствующих двум диастереомерным формам (рис. 2а). Спектр, записанный без подавления взаимодействия  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ , свидетельствует о наличии связи  $\text{P}-\text{H}$  (характерная константа спин-спинового взаимодействия  $J_{\text{PH}}$  706 Гц) (рис. 2б). Дополнительным доказательством в пользу структуры диалкилфосфита служит окрашивание продукта (IIa) нингидрином [6].

Введение в моно- и олигонуклеотиды гидрофосфорильной группы открывает широкие возможности для получения самых различных производных [7]. Для получения фосфамидных производных олигонуклеотидов мы использовали реакцию окислительного фосфорилирования по Тодду — Атертону, заключающуюся во взаимодействии диалкилфосфитов с аминами в присутствии  $\text{CCl}_4$  [8]. Эта реакция отличается легкостью превращения и отсутствием побочных продуктов. В свое время она была использована для получения аминокислотных производных адениловой кислоты [9], однако эта работа, к сожалению, не получила дальнейшего развития. Что касается получения производных олигонуклеотидов, то такие исследования вообще не проводились.

Окислительно фосфорилирование по Тодду — Атертону проводят в различных растворителях (диэтиловый и петролейный эфиры, бензол,  $\text{CCl}_4$ ); реакция проходит в течение нескольких часов при комнатной тем-

\* Эту реакцию можно проводить в других растворителях (диоксане, тетрагидрофуране, хлороформе), в этом случае в реакционную смесь следует добавлять амин для связывания  $\text{HCl}$ . При синтезе производных олигонуклеотидов мы использовали пиридин.

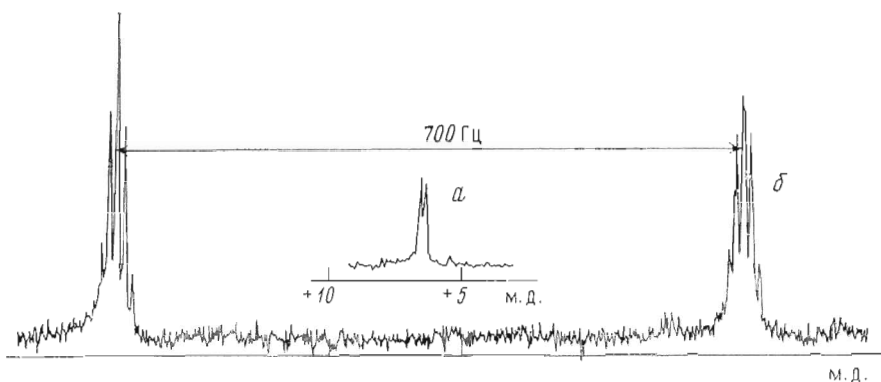


Рис. 2

Рис. 2. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР 5'-О-три-  
тилтимидин-3'-этилфосфита (IIa),  
записанные с подавлением (а) и без  
подавления (б) спин-спинового  
взаимодействия  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ , в пиридине

Рис. 3. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР 5'-О-три-  
тилтимидин-3'-этилфосфита (IIa) в  
пиридине (а), смеси 0,85 М соеди-  
нения (IIa) с бензиламином в пири-  
дине в присутствии  $\text{CCl}_4$  (соотноше-  
ние компонентов 1 : 2 : 4, моль/моль)  
(б) и смеси, полученной при взаи-  
модействии 0,85 М соединения (IIa)  
с дигидрохлоридом 4-[N-метил-N-(2-  
хлорэтил)амино]бензиламином в  
присутствии триэтиламина и  $\text{CCl}_4$   
в пиридине (соотношение компонен-  
тов 1 : 2 : 8 : 4, моль/моль) (в)

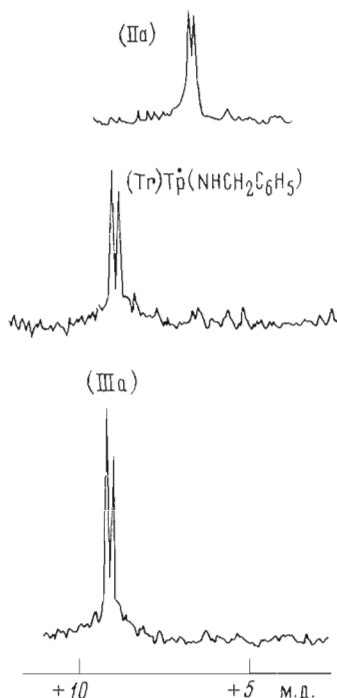


Рис. 3

пературе или при нагревании (см., например, [10—13]). Мы использовали в качестве растворителя пиридин, в котором реакция проходит в течение нескольких минут. Ускорение реакции обусловлено, очевидно, тем, что пиридин катализирует взаимодействие промежуточно образующегося хлорфосфата с амином. (При проведении этой реакции в хлороформе диалкилфосфит (IIa) со слабыми нуклеофилами (вода, спирт) практически не взаимодействует, а с бензиламином реакция проходит крайне медленно и незначительно.) Мы исследовали взаимодействие пуклеозидэтилфосфита (IIa) с аминами методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (рис. 3). При добавлении  $\text{CCl}_4$  к смеси (1 : 2, моль/моль) соединения (IIa) с бензиламином в пиридине через 4 мин в спектре не наблюдается даже следов исходного диалкилфосфита и регистрируются два синглета, соответствующие диастереомерам продукта реакции, с химическими сдвигами +9,10 и +8,90 м.д., характерными для фосфамидов [14]. Аналогично происходит взаимодействие соединения (IIa) с  $\text{RCINH}_2$  (при соотношении 1 : 2, моль/моль); при этом образуются диастереомеры фосфамида (IIIa) с химическими сдвигами +9,05 и +9,25 м.д. (в реакцию можно вводить солянокислую соль амина; в этом случае для связывания  $\text{HCl}$  следует добавлять в реакцию смесь

избыток триэтиламина). Продукт (IIIa) был выделен после гель-фильтрации на сефадексе LH-20 хроматографией на силикагеле с выходом 88% по отношению к диалкилфосфиту (IIa). УФ-спектр полученного соединения имеет  $\lambda_{\text{макс}}$  263 нм в отличие от исходного (Tr)T ( $\lambda_{\text{макс}}$  267 нм). В пользу структуры, приписываемой соединению (IIIa), кроме данных  $^{31}\text{P}$ - и УФ-спектров, свидетельствует результат кислого гидролиза: при обработке продукта соляной кислотой в условиях гидролиза фосфамидной связи выделяется амин, обнаруживаемый по реакции с нингидрином. Содержание ковалентно связанного хлора в соединении (IIIa), определенное потенциометрическим титрованием раствором  $\text{AgNO}_3$ , составило 96%. Это говорит о том, что в условиях описанного метода можно получать алкилирующие производные с сохранением активного хлора.

Предложенным методом было получено алкилирующее производное октатимидилата, этерифицированного по межнуклеотидным фосфатам  $\text{RCINH}_p(\text{Tr})_7\text{T}(\text{Lev})$  (IIIб). С этой целью этилированный октатимидилат со свободной 5'-оксигруппой был обработан 10-кратным избытком этилдиолфосфита с последующим добавлением воды. По данным ТСХ, в реакционной смеси отсутствует исходный олигонуклеотид и регистрируется продукт реакции, окрашиваемый нингидрином. Это соединение было выделено гель-фильтрацией, после чего было осуществлено его взаимодействие с 10 экв.  $\text{RCINH}_2$  по Годду — Атертону. Полученное соединение (IIIб) также было выделено гель-фильтрацией. Выход продукта 73%.

На примере реакций с тиосульфатом натрия и с  $[^{14}\text{C}]$ лизиним было показано, что соединение (IIIб) обладает алкилирующими свойствами (реакции проходят количественно).

Для того чтобы предлагаемый метод можно было распространить на получение алкилирующих производных неионных аналогов олигонуклеотидов различного состава, следовало показать, что аминогруппы гетероциклических оснований не затрагиваются при действии этилдиолфосфита. Мы показали, что при взаимодействии  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]_2\text{C}$  и  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OPCl}_2$  и последующем гидролизе реакционной смеси не образуется соединений, модифицированных по гетероциклическому основанию. Основным продуктом реакции является 3'-гидрофосфорильное производное 5'-О-диметокситритилдезокситидина. В литературе также имеются указания на то, что в реакцию с  $\text{PCl}_3$  можно вводить не защищенные по гетероциклическому основанию цуклеозиды [15].

В настоящей работе было синтезировано алкилирующее производное ундекануклеотида  $(\text{C}_6\text{H}_5\text{NH})_2p\text{TrGrCpTrCpTrCpGrCpTrTrTrNHRCl}$  (IIIв). Синтез проводили аналогично синтезу соединения (IIIб). В качестве амина использовали  $[^{14}\text{C}]\text{RCINH}_2 \cdot 2\text{HCl}$  с уд. акт.  $33,01 \cdot 10^3$  имп/мин · мкмоль. Образование продукта реакции регистрировали по включению радиоактивной метки. Количество алкилирующего производного ундекануклеотида (IIIв), определенное по радиоактивности, соответствовало его оптическому поглощению. Дополнительный анализ после кислотного гидролиза производного (IIIв) и последующей гель-фильтрации показал наличие амина в низкомолекулярной фракции. Выход продукта реакции (IIIв) составил 80%.

Таким образом, можно сделать вывод о пригодности предлагаемого метода для синтеза алкилирующих фосфамидных производных гидрофобных олигонуклеотидов различного состава. Достоинствами метода являются высокая скорость реакций, эффективность и простота исполнения.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 5'-О-триметилтимидин, дигидрохлорид 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламина и 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, полученные в ОХИ НИОХ СО АН СССР; бензиламин (Fluka, Швейцария), перегнанный над щелочью;  $[^{14}\text{C}]$ лизин (UVVVR, СССР); N-метилпиперазин (Fluka, Швейцария);  $[^{14}\text{C}]\text{RCINH}_2 \cdot 2\text{HCl}$  ( $n$ -[ $\text{CH}_2(\text{ClCH}_2 \cdot \text{CH}_2)\text{N}]_6\text{C}_6\text{H}_4^{14}\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), синтезированный И. В. Кутявиным и С. Н. Вла-

димировым (НИОХ СО АН СССР) по методу [16]; силикагель Kieselgel 60 (Merck, ФРГ); сефадекс LH-20 (Pharmacia, Швеция);  $\text{PCl}_3$  (Fluka, Швейцария). Этилдихлорфосфит синтезировали по методу [17]; 2'-дезоксиг-5'-О-диметокситритилцитидин получали, удаляя бензоильную защитную группу концентрированным аммиаком (50°С, 5 ч) с 4-<sup>15</sup>N-бензоил-2'-дезоксиг-5'-О-диметокситритилцитидина; дианилид тимидин-5'-фосфата получали по методу [18]; олигонуклеотиды с хлорфенильными защитными группами по межнуклеотидным фосфатам получали в соответствии с работой [19], используя в качестве исходных мономеров *n*-хлорфенильные эфиры 5'-нуклеотидов (ОХП НИОХ СО АН СССР), а в качестве конденсирующего агента — триизопропилбензолсульфохлорид в смеси с *N*-метилмидазолом. Переэтерификацию *n*-хлорфенильных групп в олигонуклеотидах на этильные проводили по методу [20]. *N*-Защитные группы с ундекануклеотида удаляли с помощью концентрированного аммиака при 20°С в течение 2 сут.

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол (9 : 1).

Спектры <sup>31</sup>P-ЯМР записывали на импульсном спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ ВНС-12 (Bruker, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно 85% ортофосфорной кислоты. Для стабилизации резонансных условий использовали <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O в качестве внешнего стандарта. Спектры записывали с гетероядерным подавлением спин-спинового взаимодействия <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P, если специально не оговорено. Спектр 5'-О-тримитилтимидин-3'-этилфосфита без гетероядерного подавления спин-спинового взаимодействия был записан на спектрометре WP-200 (Bruker, ФРГ) на частоте 80,02 МГц.

Реакции, исследуемые методом <sup>31</sup>P-ЯМР, проводили непосредственно в ампулах. Навески исходных веществ предварительно сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Все сосуды, в которых проводились реакции с использованием соединений трехвалентного фосфора, заполнялись аргоном; используемые растворители также насыщались аргоном. Спектры записывали через 2–5 мин после смешивания реагентов.

*5'-О-Тримитилтимидин-3'-этилфосфит (IIa)*. 485 мг (1 ммоль) (Tr)Т, растворенного в 50 мл абс. диоксана, добавили по каплям к раствору 0,55 мл (5 ммоль) C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OPCl<sub>2</sub> и 1,4 мл (10 ммоль) триэтиламина в 50 мл диоксана, охлажденного до 0°С, в течение 10 мин. Реакционную смесь выдержали 15 мин при ~20°С, добавили 10 мл воды и выдержали еще 15 мин. Затем смесь упарили, добавили 20 мл воды и продукт реакции экстрагировали хлороформом (3×10 мл). Хлороформный раствор высушили над сульфатом натрия, упарили и осадили продукт реакции в 100 мл гексана. Выход 467 мг (80%). Продукт реакции имеет несколько большую подвижность на силикагеле по сравнению с исходным (Tr)Т. Химические сдвиги диастереомеров полученного соединения приведены в таблице.

*Получение алкилирующего производного 5'-О-тримитилтимидина (IIIa)*. 28,8 мг (48 мкмоль) гидрофосфорильного производного (IIa) высушили упариванием с абс. пиридином. К остатку добавили 100 мкмоль RClNH<sub>2</sub> в 0,15 мл пиридина и 0,04 мл CCl<sub>4</sub>. (Для получения амина в виде основания дигидрохлорид амина обработали 12 М раствором аммиака в метаноле. NH<sub>4</sub>Cl осадили эфиром, эфирный раствор упарили, а остаток растворили в пиridине.) Через 10 мин провели гель-фильтрацию реакционной смеси на сефадексе LH-20 (колонка 50 мл, элюент — смесь хлороформ — этанол, 1 : 1). Фракцию, содержащую продукт, хроматографировали на силикагеле (градиент концентрации метанола в хлороформе от 0 до 10%). Выход продукта 1025 ОЕ<sub>260</sub>, что с учетом суммарного коэффициента молярного поглощения (Tr)Т и RClNH<sub>2</sub> при 260 нм, равного 24,3·10<sup>3</sup> М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>, составляет 42,3 мкмоль, или 88%. Продукт реакции имеет чуть большую подвижность на силикагеле, чем диалкилфосфит (IIa). После гидролиза полученного соединения в 0,1 М HCl при 40°С в течение 40 мин в реакционной смеси после удаления HCl обнаруживается

Химические сдвиги в  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектрах (в пиридине) исследуемых соединений, имеющих общую формулу  $(\text{Tr})\text{T}[\text{PO}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2\text{R}]$

R	$\delta$ , м. д.
-Cl	+165,5 *
-H	+6,38, +6,52
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}-$	+8,90, +9,10
$n-[\text{CH}_3(\text{ClCH}_2\text{CH}_2)\text{N}]_n\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}-$	+9,05, +9,25

\* Усредненный химический сдвиг диастереомеров.

амин по реакции с нингидрином. Химические сдвиги диастереомеров соединения (IIIa) приведены в таблице.

*Определение ковалентно связанного хлора в соединении (IIIa).* 8,5 мкмоль соединения (IIIa) обработали 80% уксусной кислотой (кипячение, 10 мин) для удаления тритильной группы (тритильная группа мешает определению ионов хлора), удалили уксусную кислоту упариванием, к остатку добавили 10 мл 0,1 М раствора NaOH и кипятили 1 ч. Затем тритилкарбинол экстрагировали хлороформом, а в водном растворе титровали ионы хлора 0,119 М раствором  $\text{AgNO}_3$  на потенциометре ЛПУ-01. Суммарное количество ионов хлора составило 8,63 мкмоль (101%). Для определения содержания хлорид-иона в соединении (IIIa) 25,5 мкмоль продукта растворили в 8 мл смеси вода — этанол (1 : 1) и добавили 2 мл 25%  $\text{HNO}_3$  в метаноле для стабилизации ковалентно связанного хлора. Через 4 ч тритилкарбинол экстрагировали хлороформом. Количество ионов хлора, определенное титрованием, составило 1,78 мкмоль, или 4,5% от общего количества хлора. Таким образом, содержание ковалентно связанного хлора в соединении (IIIa) составило ~96%.

*Синтез алкилирующего производного октатимидилата (IIIб).* 88 ОЕ<sub>270</sub>(Tr)<sub>7</sub>T(Lev) высушили упариванием с абс. пиридином и упарили до минимального объема. К полученному раствору при 0° С добавили 13 мкл 0,9 М раствора  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OPCl}_2$  в пиридине (~10-кратный избыток по отношению к олигонуклеотиду). Через 20 мин к реакционной смеси добавили 10 мкл воды и через 15 мин смесь хроматографировали на сефадексе LH-20 (колонокка 50 мл, элюент — смесь хлороформ — этанол, 1 : 1). В высокомолекулярной фракции содержится соединение, имеющее, по данным ТСХ, большую подвижность на силикагеле по сравнению с исходным олигонуклеотидом и окрашивающееся нингидрином. Полученное гидрофосфорильное производное (IIб) высушили упариванием с абс. пиридином. К остатку в минимальном объеме пиридина добавили 20 мкл пиридинового раствора  $\text{RCiNH}_2$  (9 мкмоль) и 10 мкл  $\text{CCl}_4$ . Через 15 мин реакционную смесь подвергли гель-фильтрации на сефадексе LH-20 (условия см. выше). По данным ТСХ, в высокомолекулярной фракции содержится соединение, имеющее большую подвижность на силикагеле по сравнению с промежуточным гидрофосфорильным производным (IIб). УФ-спектр продукта реакции имеет  $\lambda_{\text{макс}}$  263 нм, что свидетельствует о присоединении остатка амина к олиготимидилату. Выход продукта 72 ОЕ<sub>260</sub>, что составляет 73% по отношению к исходному соединению. При расчете выхода молярный коэффициент поглощения октатимидилата рассчитывали с учетом гипохромного эффекта для динуклеотидов [21, 22], а молярный коэффициент поглощения продукта реакции — как сумму коэффициентов  $\text{RCiNH}_2$  и октатимидилата при соответствующих длинах волн.

*Алкилирование тиосульфата натрия производным октатимидилата (IIIб).* 3 ОЕ<sub>260</sub> соединения (IIIб) растворили в 100 мкл диметилсульфоксида и добавили 80 мкл 0,01 М раствора трис-HCl (pH 7,5) и 5 мкл 1 М раствора тиосульфата натрия. Реакционную смесь выдержали при 40° С в течение 1 сут, затем из реакционной смеси удалили растворители: воду упарили, а от диметилсульфоксида освободились гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 (колонокка 10 мл, элюент — спирт). В высокомолекулярной

фракции, по данным ТСХ, не содержится исходное соединение (IIIб) и регистрируется продукт взаимодействия соединения (IIIб) с тиосульфатом, имеющий пулевую подвижность на силикагеле.

*Алкилирование [<sup>14</sup>C]лизина производным октагидримидилата (IIIб).* Соединение (IIIб) (3 ОЕ<sub>260</sub>) растворили в 50 мкл диметилсульфоксида, добавили 15 мкл 0,05 М раствора NaOH и 15 мкл водного раствора [<sup>14</sup>C]лизина, содержащего 1 мкмоль лизина с удельной радиоактивностью 532,8·10<sup>3</sup> имп/мин·мкмоль. Реакционную смесь выдержали при 40° С в течение 1 сут, затем добавили 3 мл 20% раствора этанола в хлороформе и удалили избыток лизина водной экстракцией, а затем гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 (колонка 10 мл, элюент — спирт). По данным ТСХ, в высокомолекулярной фракции отсутствует исходное соединение (IIIб) и содержатся продукты алкилирования лизина (вероятно, алкилируются обе аминогруппы лизина). Радиоактивность полученной смеси продуктов (2,5 ОЕ<sub>260</sub>; 3,2·10<sup>-2</sup> мкмоль) была равной 19,6·10<sup>3</sup> имп/мин, что соответствует присоединению 3,68·10<sup>-2</sup> мкмоль [<sup>14</sup>C]лизина к олигонуклеотиду.

*Взаимодействие 2'-дезоксид-5'-О-диметокситригилцитидина с этилди-хлорфосфитом.* 60 мкмоль [(MeO)<sub>2</sub>Tr]C в 0,3 мл абс. пиридина добавили при 0° С к 0,3 мл пиридинового раствора, содержащего 20 мкл (180 мкмоль) C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OPCl<sub>2</sub>. Через 15 мин к реакционной смеси добавили 1 мл воды и выдержали 10 мин. Продукты, содержащие нуклеотидный материал, экстрагировали хлороформом и разделили хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации метанола в хлороформе (0–15%). Основной продукт реакции (80%) — соединение, имеющее несколько большую подвижность на силикагеле по сравнению с исходным [(MeO)<sub>2</sub>Tr]C и содержащее в своем составе диметокситригилльную группу (окрашивание трифторуксусной кислотой) и гидрофосфорильную группу (окрашивание пингидрином). УФ-спектр этого соединения совпадает со спектром исходного 5'-О-диметокситригилцитидина; спектр <sup>31</sup>P-ЯМР этого соединения представляет собой два синглета с химическими сдвигами +6,70 и +6,50 м.д. На основании совокупности данных основному продукту реакции приписана структура 3'-гидрофосфорильного производного (IIIг). Среди продуктов реакции обнаружено некоторое количество непрореагировавшего исходного [(MeO)<sub>2</sub>Tr]C, а также следы соединения, имеющего нулевую подвижность на пластинках с силикагелем (предположительно 2'-дезоксид-5'-диметокситригилцитидин-3'-этилфосфат). Среди продуктов не было обнаружено соединений, имеющих УФ-спектр, отличный от спектра [(MeO)<sub>2</sub>Tr]C.

*Получение алкилирующего производного ундекануклеотида (IIIв).* Гидрофосфорильное производное ундекануклеотида (IIв) получали из 85 ОЕ<sub>260</sub> исходного олигонуклеотида аналогично синтезу соединения (IIб). После гель-фильтрации продукт высушили упариванием с абс. пиридином и к остатку в минимальном объеме пиридина добавили 40 мкл пиридинового раствора, содержащего 8 мкл CCl<sub>4</sub> и 8,65 мкмоль [<sup>14</sup>C]RCINH<sub>2</sub> с удельной радиоактивностью 33,01·10<sup>3</sup> имп/мин·мкмоль. Через 15 мин продукты реакции осаднили добавлением 1 мл эфира; супернатант, содержащий основную часть непрореагировавшего амина, отделили центрифугированием, осадок растворили в 50 мкл смеси хлороформ — этанол (1:1) и провели гель-фильтрацию на сефадексе LH-20 (колонка 50 мл, элюент — смесь хлороформ — этанол, 1:1) для отделения продукта реакции от оставшегося амина. Выход продукта (IIIв) 80%. Включение радиоактивной метки составило 92%. Коэффициент молярного поглощения ундекануклеотида рассчитывали в соответствии с правилом, предложенным в работе [22], используя приведенные в работе [21] коэффициенты молярного поглощения для динуклеотидов. Для отщепления амина проводили гидролиз продукта в 0,1 М HCl при 40° С в течение 40 мин.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С., Стефанович Л. Е. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1512–1522.

3. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Биорган. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 886-894.
4. Veaucaige S. L., Caruthers M. H. Tetrahedron Lett., 1981, v. 22, № 20, p. 1859-1862.
5. Пурдела Д., Вьлчану Р. Химия органических соединений фосфора. М.: Химия, 1972, с. 195-200.
6. Предводителев Д. А., Иванов В. И., Аларкон Х. Х., Нифантьев Э. Е. Журн. общ. химии, 1978, т. 48, № 6, с. 1273-1276.
7. Нифантьев Э. Е. Химия гидрофосфорильных соединений. М.: Наука, 1983, с. 1-263.
8. Atherton F. R., Openshaw H. T., Todd R. R. J. Chem. Soc., 1945, № 2, p. 660-663.
9. Шабарова З. А., Сагарова И. Г., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1958, т. 123, № 5, с. 864-869.
10. Предводителев Д. А., Чукбар Т. Г., Зеленева Т. П., Нифантьев Э. Е. Журн. орган. химии, 1981, т. 17, № 6, с. 1305-1315.
11. Предводителев Д. А., Чукбар Т. Г., Урванцева Г. А., Нифантьев Э. Е. Журн. общ. химии, 1974, т. 44, № 5, с. 1203-1206.
12. Боев В. И., Домбровский А. В. Журн. общ. химии, 1979, т. 49, № 6, с. 1246-1249.
13. Гречкин Н. П., Никонорова Л. Н. Изв. АН СССР. ОХН, 1969, № 5, с. 1180-1182.
14. Лебедев А. В., Резвухин А. И. Биорган. химия, 1983, т. 9, № 2, с. 149-185.
15. Кабачник М. М., Потапов В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1971, т. 201, № 4, с. 858-861.
16. Богачев В. С., Веньяминова А. Г., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1970, № 14, вып. 6, с. 110-177.
17. Menshutkin N. Ann. Chem. Pharm., 1866, B. 139, S. 343-354.
18. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Семенова Л. Н., Шубина Т. Н. Биорган. химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1137-1139.
19. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Ромащенко В. П. Биорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 518-521.
20. Петренко В. Л., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. Н. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 431-435.
21. Fasman T. E. Handbook of biochemistry and molecular biology. Cleveland: Nucleic Acids CRC Press, 1975, v. 1, p. 597.
22. Cantor C. R., Tinoko I. J. Mol. Biol., 1965, v. 13, № 1, p. 65-77.

Поступила в редакцию  
16.II.1984  
После доработки  
30.VII.1984

## USE OF ETHYLDICHLOROPHOSPHITE IN THE SYNTHESIS OF ALKYLATING PHOSPHOROAMIDATES ON NON-IONISABLE OLIGONUCLEOTIDE ANALOGUES

LEVINA A. S., IVANOVA E. M.

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

A convenient and effective method is suggested for the preparation of alkylating phosphoroamidates of non-ionisable oligonucleotide analogues. The method includes two successive stage. The first one is phosphorylation of the terminal OH-group of oligonucleotide with ethyldichlorophosphite followed by hydrolysis of forming dialkylchlorophosphite; the second stage is the reaction of hydrophosphoryl oligonucleotide derivative with 4-[N-methyl-N-(2-chloroethyl)amino]benzylamine (RCINH<sub>2</sub>) in the presence of CCl<sub>4</sub>. The method allows the preparation of both 3'- and 5'-derivatives of oligonucleotides. The alkylating derivatives of two oligonucleotide ethyl phosphotriesters were synthesized: RCINH<sub>p</sub>(Tp)<sub>7</sub>T(Lev) and (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH)<sub>2</sub>pTpGpCpTpCpTpGpGpTpT pTpNHRCI (symbol p means internucleotide ethyl phosphate).