



УДК 547.963.32.057:542.95

© 1991 г.

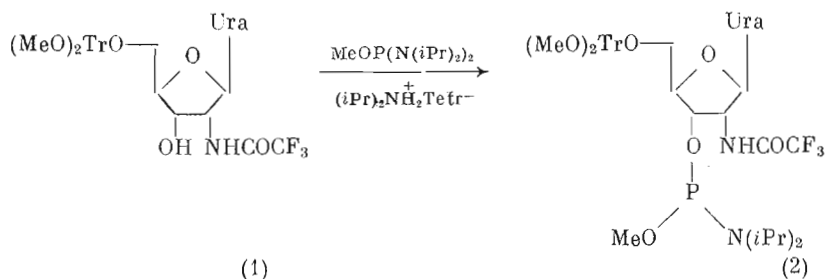
*Л. Г. Кузнецова, Е. М. Волков, Е. А. Романова,  
В. Н. Таплицкий, Т. С. Ореукая, З. А. Шабарова*

**СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ  
2'-АМИНО-2'-ДЕЗОКСИУРИДИНОВЫЕ ЗВЕНЬЯ**

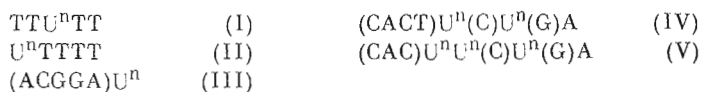
*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет*

Ранее нами осуществлен синтез ряда фрагментов ДНК с направленной заменой 2'-дезоксирибонуклеозидных звеньев на рибо- [1], 2'-фтор-2'-деокси- и 1-β-D-арабинофуранозилпиримидиновые нуклеозиды [2]. Эти работы направлены на поиск оптимальных структур олигодезоксирибонуклеотидных зондов для изучения региоспецифического гидролиза РНК РНКазой H из *E. coli*. В продолжение этих исследований был разработан метод синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 2'-амино-2'-дезоксинуридиновые звенья.

Синтез 5'-O-диметокситригил-2'-трифторацетиламино-2'-деокси-3'-(N,N-диизопропиламино)метилфосфита уридина осуществлен из уридина последовательными реакциями селективного тритилирования 5'-гидроксильной группы, замыкания 2,2'-ангидроцикла [3], размыкания последнего аналогично методике [4] азидом лития в диметилформамиде и восстановления азидогруппы трифенилфосфином [5]. Ацилирование алифатической аминогруппы проводили этиловым эфиром трифторуксусной кислоты, а фосфитилирование соединения (1) осуществляли бис(N,N-диизопропиламино)метилфосфитом аналогично получению 3'-амидофосфитов дезоксирибонуклеозидов [6]:



ТСХ-контроль свидетельствовал о полном превращении соединения (1) в амидофосфит (2). Полученное нуклеотидное производное (2) введено в амидофосфитный олигонуклеотидный синтез по стандартному регламенту получения олигодезоксирибонуклеотидов на автоматическом синтезаторе «Виктория-4М» с увеличением времени конденсации до 5 мин. Синтезированы следующие олигодезоксирибонуклеотиды с 2'-амино-2'-дезоксинуридиновыми звеньями:



Используемые сокращения: U<sup>n</sup> — 2'-амино-2'-дезоксинуридин; TetrH — 1H-тетразол. Префикс «d» (дезокси) опущен, 2'-дезоксирибонуклеотиды заключены в скобки.

Олигодезоксирибонуклеотид (III), содержащий 2'-амино-2'-дезоксиринидин на 3'-конце олигонуклеотида, синтезирован путем предварительного присоединения 5'-О-диметокситритил-2'-трифторацетамидо-2'-дезоксиринидина к полимерному носителю LCAA/CPG-500 по стандартной методике [7].

Нами был получен также 5'-О-диметокситритил-2'-монометокситритиламино-2'-дезоксиринидин-3'-(N,N-диизопропиламидо)метилфосфит уридина. Попытки ввести данный нуклеотидный компонент в амидофосфитный олигонуклеотидный синтез на твердой фазе оказались безуспешными. По-видимому, причиной этого является пространственное экранирование реакционного центра (атома фосфора) объемной монометокситригильной группой.

Структуры соединений (1) и (2) подтверждены результатами ЯМР-спектроскопии.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр соединения (1) ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.): 6,12 (д, 1H, H-1',  $J_{1',2'}$  8,03 Гц), 4,67 (м, 1H, H-2'), 4,53 (м, 1H, H-3'), 4,20 (м, 1H, H-4', X-часть системы АВХ), 3,50 (АВ-часть системы АВХ, 2H, H-5',  $J_{\text{AB}}$  10,77;  $J_{\text{AX}} = J_{\text{BX}} = 3,14$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектр соединения (2) ( $\text{CDCl}_3$ ): 149,86 и 150,18 м.д.

Нуклеотидную последовательность 2'-амино-2'-дезоксиринидинсодержащих олигонуклеотидов (I)–(V) подтверждали модифицированным методом Максама — Гилберта [8]. В месте введения 2'-амино-2'-дезоксиринидина отсутствует радиоактивность во всех четырех колонках геля. По-видимому, после обработки олигодезоксирибонуклеотида  $\text{KMnO}_4$  не происходит расщепления N-гликозидной связи пиперидином, что обусловлено электронодонорными свойствами аминогруппы.

Нуклеозидный состав олигонуклеотидов (I)–(V) определяли исчерпывающим гидролизом смесью фосфодиэстеразы и фосфомоноэстеразы змеиного яда в течение 3 ч при 37° С с последующим анализом гидролизата ВЭЖХ в изократическом режиме и сравнением с контрольной смесью нуклеозидов, соответствующей составу исследуемого олигонуклеотида.

Положительные результаты реакции олигонуклеотидов (I) и (II) с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) также подтверждают наличие аминогруппы. В результате реакции и после выделения методом гель-фильтрации с выходом около 90 % были получены производные олигонуклеотидов (I) и (II) с FITC. Они имеют характерные спектры поглощения с максимумами при 260 и 493 нм, что соответствует поглощению олигонуклеотидной и флуоресцеиновой частей.

Было обнаружено, что олигонуклеотиды, содержащие 2'-амино-2'-дезоксиринидиновые звенья, устойчивы в условиях щелочного гидролиза РНК (0,1 М  $\text{NaHCO}_3$ , 5 мин, 95° С, pH 11,25). По-видимому, аминогруппа в 2'-амино-2'-дезоксиринидине не содействует расщеплению межнуклеотидной связи через образование циклофосфата. Есть основания ожидать, что олигодезоксирибонуклеотиды с данными модифицированными звеньями будут устойчивы к действию рибонуклеаз.

Таким образом, предложенная модификация открывает перспективу использования данных субстратов при изучении механизмов функционирования ферментов нуклеинового обмена. Кроме того, эффективное взаимодействие таких олигонуклеотидов с химическими реагентами, подобными FITC, дает возможность получения множественно нерадиоактивно-меченых олигонуклеотидов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Романова Е. А., Ореуцкая Т. С., Сухолинов В. В., Крынецкая Н. Ф., Метелев В. Г., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 10. С. 1348–1354.
2. Шмидт С., Кузнецова Л. Г., Романова Е. А., Нилман А., Ореуцкая Т. С., Крынецкая Н. Ф., Метелев В. Г., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 6. С. 823–830.
3. Hampton A., Nichol A. W. // Biochemistry. 1966. V. 5. № 6. P. 2076–2082.
4. Verheyden J. P. H., Wagner P., Moffart J. G. // J. Org. Chem. 1971. V. 36. № 2. P. 250–254.
5. Mungall W. S., Greene G. L., Heavnerand G. A., Letsinger R. L. // J. Org. Chem. 1975. V. 40. P. 1659.

6. Barone A. D., Tang J. U., Caruthers M. N. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 10. P. 4051—4061.
7. Грязнов С. М., Потанов В. К., Метелев В. Г., Елов А. А., Пурмаль А. А., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 988—991.
8. Rosenthal A., Schubert F., Cech D., Orezkaja T. S., Kusnezova S. A., Shabarova Z. A. // Biomed. and biochim. acta. 1985. V. 44. № 10. P. 75—83.

Поступило в редакцию  
26.IV.1991

L. G. KUZNETSOVA, E. M. VOLKOV, E. A. ROMANOVA, V. N. TASHLITSKY,  
T. S. ORETSKAYA, Z. A. SHABAROVA

**CHEMICAL SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES CONTAINING  
2'-AMINO-2'-DEOXYURIDINE RESIDUES**

*Chemical Department, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

A synthesis of phosphoramidite derivative of 2'-amino-2'-deoxyuridine which allows one to introduce point modifications into any position of the oligodeoxyribonucleotide chain by means of the standard solid phase phosphoramidite method has been developed.