



УДК 547.963.32.057 : 542.95

© 1993 Л. Г. Кузнецова, Е. А. Романова,
Е. М. Волков, В. Н. Ташлицкий, Т. С. Орецкая,
Н. Ф. Крынецкая, З. А. Шабарова

ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ 2'-АМИНО-2'-ДЕЗОКСИПИРИМИДИНОВЫЕ НУКЛЕОЗИДЫ

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

Разработан способ синтеза модифицированных нуклеотидных компонентов твердофазного амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов для введения в олигонуклеотидную цепь 2'-амино-2'-дезоксипиримидиновых нуклеотидов. Описан синтез серии модифицированных олигонуклеотидов длиной от 5 до 20 нуклеотидных звеньев. Изучена гидролитическая устойчивость олигомеров в интервале рН 7—11,5. Показана высокая реакционная способность 2'-аминогруппы при ацилировании. Исследована возможность образования дуплексов модифицированных олигонуклеотидов с комплементарными НК-матрицами.

В последнее время появилось много работ по синтезу олигонуклеотидов с алифатическими аминогруппами, которые необходимы для последующего введения репортерных групп, нерадиоактивных меток, иммобилизации олигонуклеотидов, пришивки их к белку и т. д. [1—5]. Аминогруппы через полиметиленовые звенья присоединялись либо к гетероциклическому основанию нуклеозида [1—4], либо к фосфатной группе [5].

Особый интерес представляет введение аминогруппы в 2'-положение углеводного фрагмента. Ранее было показано, что модификация у С2'-атома сахарного остатка в олигонуклеотидах придает им уникальные свойства, например изменяет конформацию сахарного кольца, препятствует нуклеазному гидролизу [6, 7].

Олигонуклеотиды, содержащие 2'-амино-2'-дезоксинуклеозиды, были использованы в работе Экштейна [8] при изучении каталитических свойств рибозимов. Однако подробное описание синтеза и свойств нового класса соединений, какими являются олигодезоксирибонуклеотиды с 2'-аминонуклеозидными вставками, в статье отсутствует. Нами ранее опубликован синтез олигонуклеотидов, содержащих 2'-амино-2'-дезоксиуридиновые звенья [9]. Настоящая работа — продолжение исследований по синтезу модифицированных олигонуклеотидов и изучению их химических и физико-химических свойств.

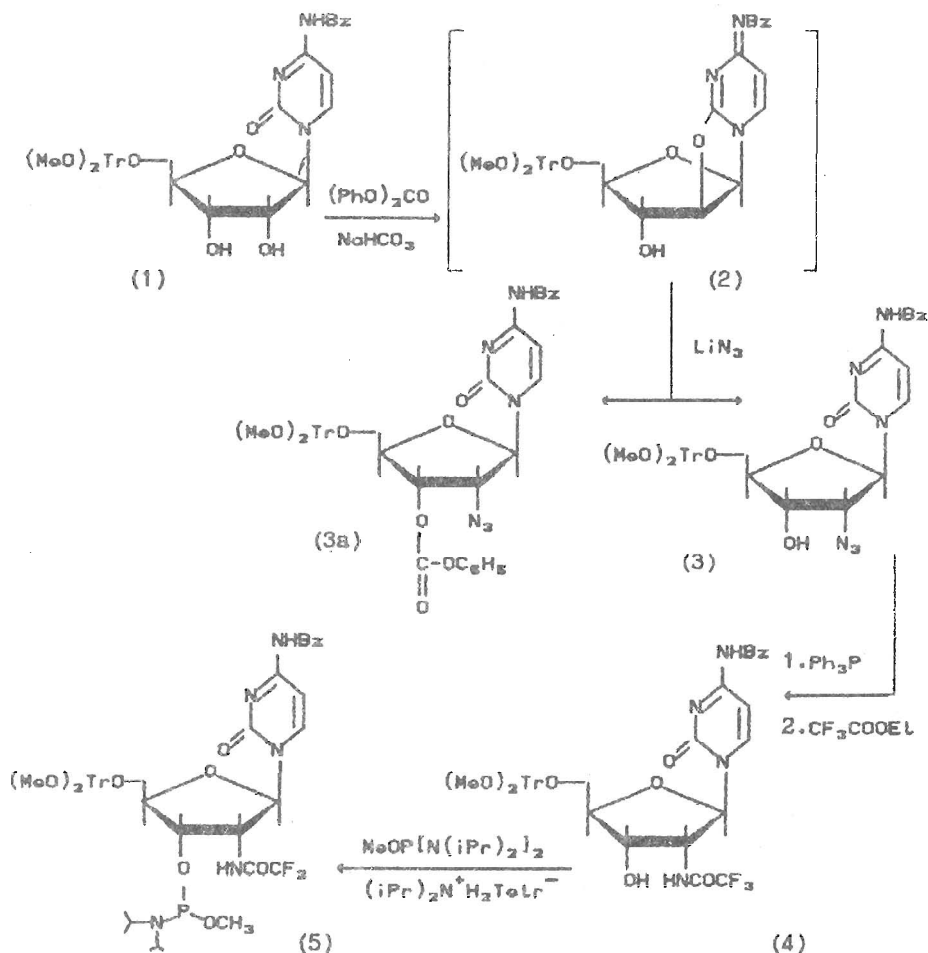
Синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 2'-амино-2'-дезоксцитидин

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 2'-амино-2'-дезоксирибопиримидиновые нуклеозиды, предполагает решение ряда задач. Одна из них заключается в выборе оптимального метода получения модифицированного ами-

Используемые сокращения: Uⁿ — 2'-амино-2'-дезоксиуридин; Cⁿ — 2'-амино-2'-дезоксцитидин; FITC — флуоресцеинизотиоцианат; TetH — 1H-тетразол. Префикс «d» (дезокси) при написании 2'-дезоксирибонуклеотидов опущен.

дофосфитного производного, которое может быть встроено в олигонуклеотидную цепь в процессе синтеза.

5'-О-Диметокситритил-N⁴-бензоил-2'-трифторацетиамидо-2'-дезоксигидроцитидин (1) был получен из цитидина последовательными реакциями селективного тритилирования 5'-гидроксильной группы и бензоилирования экзациклической аминогруппы с образованием соединения (1), замыкания 2,2'-ангидроцикла [10], размыкания последнего азидом лития в диметилформамиде [11] и восстановления азидогруппы последнего соединения (3) трифенилфосфином (см. схему). Ацилирование алифатической аминогруппы проводили этиловым эфиром трифторуксусной кислоты, а фосфитилирование соединения (4) осуществляли бис(N,N-диизопропиламино)метилфосфитом аналогично получению 3'-амидофосфитов дезоксирибонуклеозидов [12]. Все вышеуказанные защитные группы удаляются в условиях стандартных постсинтетических обработок олигонуклеотидов.



Следует отметить, что реакция замыкания 2,2'-ангидроцикла цитидина и размыкание его азидом лития проводились в одной колбе. Это обусловлено лабильностью соединения (2), превращающегося в арабиноцитидин при попытках выделения [7]. В результате реакции размыкания ангидроцикла цитидина образуются два основных продукта реакции в равных соотношениях. После хроматографии реакционной смеси на силикагеле обнаружено, что оба соединения

содержат азидогруппу с характерной полосой поглощения в ИК-спектре 2120 см^{-1} .

Для идентификации искомого продукта реакции встречным синтезом получен 5'-О-диметокситритил-N⁴-бензоил-2'-азидо-2'-дезокситидин из 5'-О-диметокситритил-2'-азидо-2'-дезоксидуридина по методике, используемой обычно для превращения производных уридина в производные цитидина [13]. Отметим, что такой путь получения соединения (3) значительно длиннее выбранного нами. Результаты анализа методом ¹H-ЯМР-спектроскопии одного из двух продуктов, синтезированных по предложенной нами методике, и соединения, полученного встречным синтезом, показали их идентичность.

Для выяснения природы второго продукта (3а) проведен ряд исследований. ИК-спектр его в отличие от ИК-спектра основного соединения помимо характерных полос поглощения азидогруппы и 4-бензамидной группы содержит характерную полосу при 1724 см^{-1} , соответствующую валентным колебаниям С=О-группы в фенолкарбонатах. УФ-спектры обоих соединений в области $3000\text{—}2100 \text{ см}^{-1}$ аналогичны, что свидетельствует об идентичности строения их гетероциклических оснований. Главное различие в ¹H-ЯМР-спектрах этих продуктов наблюдается в химических сдвигах 3'-протонов (4,50 и 5,51 м.д.). Значительное смещение сигнала 3'-протона соединения (3а) в слабое поле может быть обусловлено наличием фенолкарбонатного заместителя в 3'-положении сахара. Суммарный интеграл в области обнаружения ароматических протонов для соединения (3а) увеличивается на 5 протонов по сравнению с интегралом для соединения (3). Кроме того, наличие 2'-азидогруппы и 3'-фенолкарбонатного заместителя подтверждается успешным восстановлением азидогруппы соединения (3а) и последующим ацилированием 2'-аминогруппы, с одной стороны, и неспособностью полученного производного взаимодействовать с фосфитилирующим реагентом — с другой. Результаты ИК-, УФ-, ¹H-ЯМР-спектроскопии свидетельствуют о том, что продукт (3а) является, по-видимому, 5'-О-диметокситритил-2'-азидо-2'-дезоксидо-3'-фенолкарбонатом цитидина, образование которого возможно благодаря избытку дифенолкарбоната в реакционной смеси.

Таким образом, несмотря на наличие побочного продукта, от которого несложно освободиться с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, предложенный метод получения модифицированных нуклеотидных компонентов олигонуклеотидного синтеза на основе 2'-аминопиримидиновых нуклеозидов достаточно прост и эффективен. Амидофосфиты производных 2'-аминоуридина и 2'-аминоцитидина введены в олигонуклеотидный синтез по стандартному регламенту получения олигодезоксирибонуклеотидов на автоматических синтезаторах «Виктория-4М» и Applied Biosystems 380В с увеличением до 5 мин времени конденсации на стадии включения в цепь модифицированного звена. Синтезированы следующие олигодезоксирибонуклеотиды с 2'-амино-2'-дезоксипиримидиновыми звеньями:

TTU ⁿ TT	(I)	TTC ⁿ TT	(IX)
U ⁿ TTTT	(II)	ACCAC ⁿ CGCGC ⁿ T	(X)
T ₈ (U ⁿ T ₂) ₄	(III)	ACCAC ⁿ CGC ⁿ GC ⁿ T	(XI)
ACGGAU ⁿ	(IV)	ACCAC ⁿ C ⁿ GC ⁿ GC ⁿ T	(XII)
CACTU ⁿ CU ⁿ GrA	(V)		
CACU ⁿ U ⁿ CU ⁿ GrA	(VI)		
CTACU ⁿ CU ⁿ CGC	(VII)		
CTACU ⁿ CU ⁿ CGrC	(VIII)		

Олигонуклеотиды (I), (II), (IX) — модели, полученные при отработке условий синтеза. Олигонуклеотиды (V)—(VIII), (X)—(XII) комплементарны различным участкам 5S РНК рибосом *E. coli*. Синтез олигонуклеотидов (I), (II), (IV), (V), (VI) описан нами ранее [9].

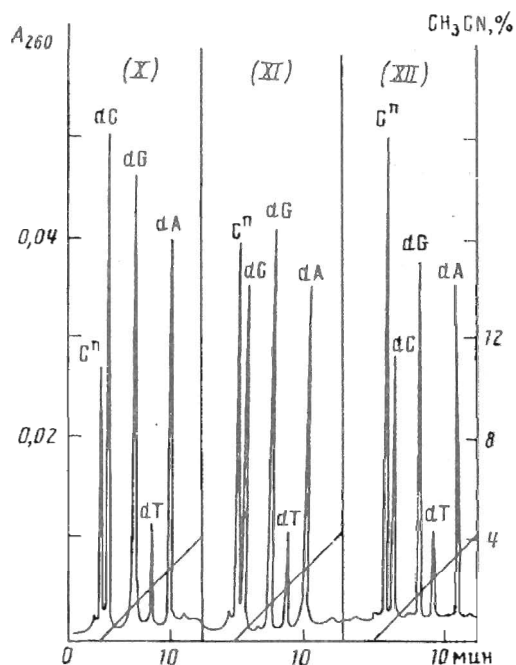


Рис. 1. ВЭЖХ-анализ нуклеозидного состава модифицированных олигонуклеотидов (X)—(XII) после их гидролиза смесью щелочной фосфатазы и фосфодиэстеразы змеиного яда (условия см. «Экспер. часть»)

Удаление защитных групп с гетероциклических оснований в модифицированных олигонуклеотидах проводили по стандартной схеме [7] и продукты выделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, используя гидрофобные свойства 5'-О-диметокситритильной группы, с последующим детритилированием целевых олигонуклеотидов. Выходы модифицированных олигонуклеотидов составляли 10—15%, при стандартных выходах немодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов 10—20%.

Нуклеотидную последовательность полученных олигонуклеотидов подтверждали методом химической модификации оснований [14]. Как мы уже отмечали [9], после обработки олигонуклеотида перманганатом калия и пиперидином в месте введения 2'-амино-2'-дезоксигуанидина отсутствует радиоактивность во всех четырех колонках геля. Положения 2'-амино-2'-дезокситидина «прочитываются» как цитидин при обработке олигонуклеотидов гидроксиламином.

Нуклеозидный состав соединений (I)—(XII) подтверждали их исчерпывающим гидролизом смесью щелочной фосфатазы и фосфомоноэстеразы змеиного яда в течение 3 ч при 37° С с последующим анализом гидролизата ВЭЖХ. Типичные профили элюции, полученные при анализе гидролизатов олигонуклеотидов (X)—(XII) с различным числом 2'-аминонуклеозидов, приведены на рис. 1.

Свойства олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 2'-амино-2'-дезоксипиридиновые звенья

Полученные модифицированные олигодезоксирибонуклеотиды представляют собой малоизученный класс соединений, и исследование их химических и физико-химических свойств вызывает большой интерес, в том числе для определения области возможного применения.

Нами было обнаружено, что олигонуклеотиды, содержащие 2'-амино-2'-дезоксигуанидин, устойчивы в условиях щелочного гидролиза РНК (0,1 М $NaHCO_3$,

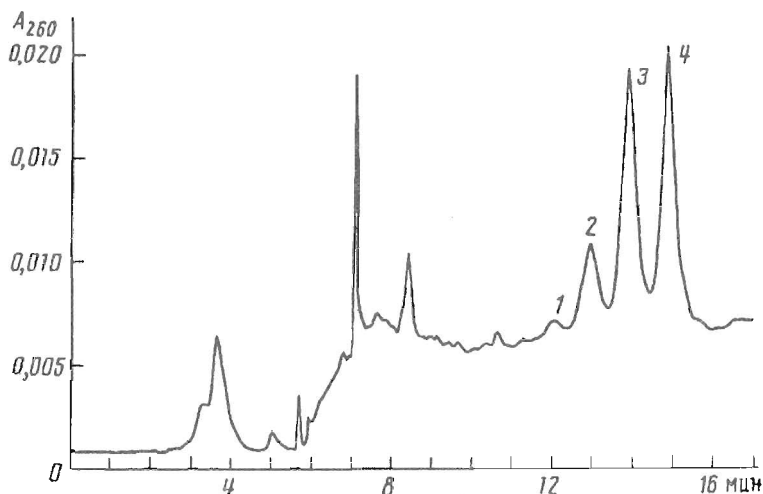


Рис. 2. ВЭЖХ-анализ (ион-парный вариант) реакционной смеси, полученной при взаимодействии олигонуклеотида (III) с FITC (условия см. «Экспер. часть»). Пики 1—4 — моно-, ди-, три- и тетрафлуоресцеинизотиоцианатные производные

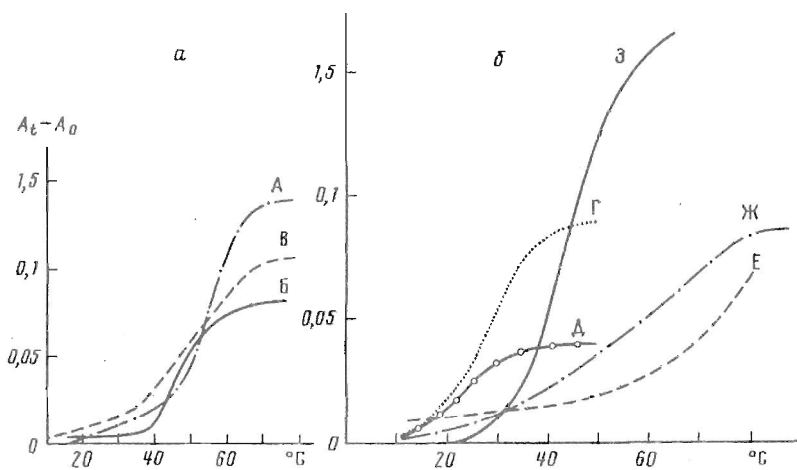


Рис. 3. Кривые температурной зависимости УФ-поглощения (λ 260 нм) олигонуклеотидных дуплексов А, Б, В (а); Г, Д, Е, Ж, З (б) в SSC-буфере (0,15 М NaCl, 0,015 М цитрат натрия, pH 7,25). ζ_0^{20} приведены в таблице

5 мин, 95° С, pH 11,25). По-видимому, аминогруппа 2'-амино-2'-дезоксиридина в отличие от 2'-гидроксильной группы не способна образовать циклический фосфамид.

Высокая реакционность 2'-аминогруппы уридина в составе олигонуклеотидов продемонстрирована реакциями данных олигонуклеотидов с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) и ацелированием аминогрупп.

В результате реакции с FITC были получены с выходами 90% производные олигонуклеотидов (I) и (II), имеющие характерные спектры поглощения с максимумами: 262,4, 475,6 и 264,4, 478,8 нм соответственно, что отвечает поглощению олигонуклеотидной и флуоресцеиновой частей. При взаимодействии 20-звенного олигонуклеотида (III), содержащего четыре 2'-амино-2'-дезоксиридиновых звена, с FITC образуются четыре продукта, которые соответствуют реакции FITC с одной, двумя, тремя и четырьмя аминогруппами олигонуклеотида. Соотношение данных продуктов реакции составляет соответственно 3,7, 12,3, 39,5, 44,5% (рис. 2).

Некоторые характеристики синтетических модифицированных ДНК-дуплексов

ДНК-дуплекс	$C_0^{20} \cdot 10^4$, М	Шифр	Модификация, %	Т. пл., °С (± 1)	h, % (± 1)
ACCAC ⁿ CGCGC ⁿ T CCTGGTG GCGCG AGTG	0,33	А	18	58	20
ACCAC ⁿ CGC ⁿ GC ⁿ T CCTGGTG GCG CG AGTG	0,29	Б	27	48	12
ACCAC ⁿ C ⁿ GC ⁿ GC ⁿ T CCTGGTG G CG CG AGTG	0,29	В	36	40	15
ACCACCGCGCT CCTGGTGGCGCGAGTG	0,30	М	—	63 ^{2*}	14
CTACU ⁿ CU ⁿ CGC GGATGA GA GCGT	0,30	Г	20	31	13
CTACU ⁿ CU ⁿ CGrC GGATGA GA GC GT	0,22	Д	20	24	8
CTACTCTCGC GGATGAGAGCGT	0,30	И	—	50 ^{2*}	16
CACTU ⁿ CU ⁿ GrA AGTGAA GA CTCAA	0,30	Е	22	—	15
CACU ⁿ U ⁿ CU ⁿ GrA AGTGA A GA CTCAA	0,27	Ж	33	—	12
CACTTCTGAG AGTGAAGACTCAA	0,33	З	—	48	23
TTTTTTTTU ⁿ TTU ⁿ TTU ⁿ TTU ⁿ TT AAAAAAAAAAA AAA AAA AAA AAA	0,24	И	20	22	24
T ₈ (U ⁿ T ₂) ₄ /A ₂₂	0,15	К	20	16	14
T ₈ (U ⁿ T ₂) ₄ /A ₂₂	0,05	Л	20	28	11

* C_0^{20} — концентрация дуплексов.

^{2*} Данные взяты из работы [7].

^{3*} Uⁿ — ацилированный по 2'-аминогруппе Uⁿ.

^{4*} Uⁿ — FITC-производное по 2'-аминогруппе Uⁿ.

Ацилирование проводили уксусным ангидридом в боратном буфере (рН 8,5). В этих условиях модельный олигонуклеотид (I) ацилируется полностью, а олигонуклеотид (III) образует три продукта: олигонуклеотиды с двумя, тремя и четырьмя ацилированными аминогруппами в соотношении 1 : 10 : 20.

Методом УФ-спектроскопии изучена термическая устойчивость дуплексов, образованных модифицированными олигонуклеотидами и комплементарными им олигодезоксирибонуклеотидами (таблица).

Для первой серии дуплексов (А—В), содержащих в модифицированной олигонуклеотидной цепи 2'-амино-2'-дезокситидин, характерно снижение гипохромии (h) и температуры плавления по мере увеличения числа модифицированных звеньев в сравнении с немодифицированным дуплексом (М) (таблица, рис. 3а). Для второй серии дуплексов (Г—Ж), включающих 2'-аминоуридин, наблюдается зависимость стабильности не только от количества модифицирован-

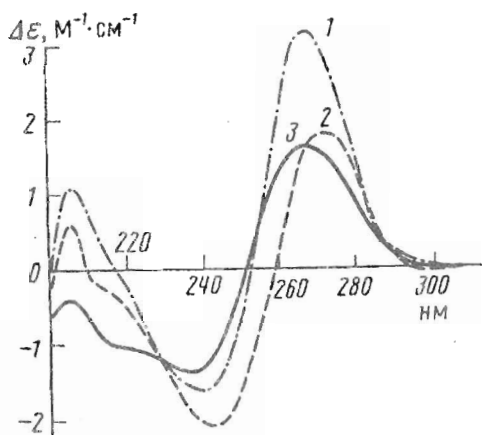


Рис. 4. Спектры КД: 1 — TrU^n ; 2 — U^npT ; 3 — $(\text{U}^n + \text{pT})$. Температура 20°C (условия см. в подписи к рис. 3)

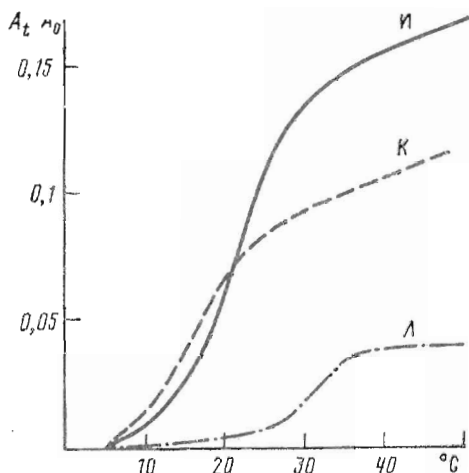


Рис. 5. Кривые температурной зависимости УФ-поглощения (λ 260 нм) олигонуклеотидных дуплексов И, К и Л в SSC-буфере (условия см. подпись к рис. 3). ϵ_{260}^{20} приведены в таблице

ных нуклеозидов, но и от первичной структуры олигонуклеотидов. Кривые плавления дуплексов (Г) и (Д) (рис. 3б) отражают кооперативность процесса плавления, хотя величины температур плавления модифицированных дуплексов ниже, чем немодифицированного дуплекса (Н) (см. таблицу).

Общий вид кривых плавления дуплексов (Е) и (Ж) не типичен для двуспиральных олигонуклеотидных комплексов [15]. Низкая гипохромия и отсутствие кооперативности процесса плавления (рис. 3б) скорее всего показывают температурную зависимость УФ-поглощения отдельных олигонуклеотидов. По-видимому, 2'-амино-2'-дезоксипримидиновые звенья действуют как дестабилизирующий фактор при образовании ДНК-дуплексов. То, что для дуплексов (А)—(Д) это влияние наблюдается в меньшей степени, можно объяснить их богатым G·C-содержанием, которое частично компенсирует этот эффект (для дуплексов (А), (Б), (В) G·C-содержание составляет 72%, для (Г), (Д) — 60%, а для (Е), (Ж) — 44%).

Для характеристики внутримолекулярного стэкинг-взаимодействия в модифицированных олигонуклеотидах изучены КД-спектры динуклеозидфосфатов U^npT и TrU^n . Спектр U^npT (рис. 4) близок к суммарному спектру составляющих его мономеров, что свидетельствует о почти полном отсутствии межплоскостных взаимодействий гетероциклических оснований. Напротив, спектр TrU^n (рис. 4) имеет характерный экситонный тип, отличный от спектра невзаимодействующих компонентов, что свидетельствует о наличии стэкинг-взаимодействий. Эти результаты подтверждают дестабилизирующую роль 2'-аминонуклеозидов, включенных внутрь олигонуклеотидной цепи. Дестабилизирующее влияние 2'-аминогрупп в составе олигонуклеотидной цепи может быть обусловлено их способностью протонироваться и образовывать внутреннюю соль с соседней межнуклеотидной фосфатной группой.

Для проверки данной гипотезы мы изучили термическую устойчивость дуплексов при повышенном значении pH и с заблокированными 2'-аминогруппами. pK_a аминогруппы 2'-амино-2'-дезоксипримидина и 2'-амино-2'-дезоксцитидина, определенные методом титрования, равны 7,4, т. е. в SSC-буфере (pH 7,3) 2'-аминогруппа модифицированного звена в составе дуплексов (А)—(Ж) на 50% была в протонированной форме. При исследовании термической устойчивости дуплексов (Е) и (Ж) при pH 8,5 принципиальных изменений в поведении кривых плавления не наблюдалось. Далее pH буферного раствора не повышали, так как

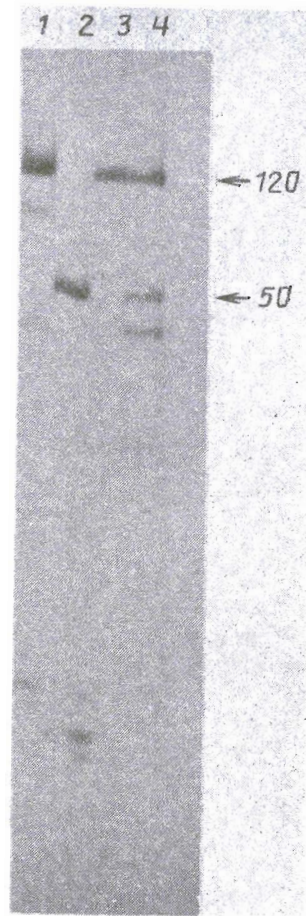


Рис. 6. Авторадиограмма разделения в 20% ПААГ продуктов гидролиза $3'$ - ^{32}P -меченой 5S рРНК после инкубации с РНКазой Н (30 мин, 25°C) в присутствии САСТТСТГАГ (2), (VI) (3), (V) (4). Дорожка 1 — исходная РНК. Цифры у стрелок обозначают длину олигонуклеотидных фрагментов (число нуклеотидных звеньев)

это снизило бы устойчивость дуплекса из-за сдвига равновесия между таутомерными формами гетероциклических оснований.

Кривые плавления дуплексов, содержащих блокированные 2'-аминогруппы (дуплексы (К) и (Л)), показаны на рис. 5. Как видно из рис. 5, плавление всех дуплексов кооперативно, однако в ацетилированном дуплексе (К) наблюдается снижение гипохромии и температуры плавления (рис. 5) по сравнению с неацетилированным (И). Таким образом, ацетильная группа не способствует стабилизации модифицированной двойной спирали. Дуплекс (Л), содержащий флуоресцинированный олигонуклеотид, термодинамически более устойчив (см. таблицу и рис. 5).

Изучена эффективность гидролиза 5S РНК рибонуклеазой Н в присутствии олигонуклеотидов (V)—(VIII). Показано, что расщепление отсутствует в дуплексе с олигонуклеотидом (VI). В присутствии олигонуклеотида (V) эффективность гидролиза не превышает 40% по сравнению с 80%-ным гидролизом РНК в присутствии САСТТСТГА (рис. 6). По-видимому, снижение степени гидролиза связано с дестабилизирующим влиянием 2'-аминогруппы на образование гибридного дуплекса.

Таким образом, в настоящей работе предложен метод введения 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидов в олигодезоксирибонуклеотидную цепь в процессе ав-

томатического амидофосфитного синтеза. Показана высокая реакционная способность 2'-аминогрупп олигонуклеотидов в реакциях ацилирования. Производное с флуоресцеинизотиоцианатной группой может быть использовано для нерадиоактивного мечения олигонуклеотидных зондов. Результаты физико-химического изучения олигонуклеотидных дуплексов, в состав которых входят модифицированные олигонуклеотиды (V) — (XII), показывают, что введение 2'-амино-2'-дезоксипиримидиновых нуклеозидов в олигонуклеотидную цепь снижает устойчивость дуплексов. Успешное применение таких модифицированных олигонуклеотидов в качестве гибридизационных зондов возможно лишь при условии их богатого G·C-состава или введения модификаций по 3'- или 5'-концам олигонуклеотида.

Экспериментальная часть

В работе использовали 5'-О-диметокситритил-3'-(N, N-диизопропиламидо)-β-цианэтилфосфиты 2'-дезоксирибонуклеозидов (Applied Biosystems, США); уридин (Reanal, Венгрия); цитидин (Fluka, Швейцария); тетразол, N, N-диизопропиламин, дифенилкарбонат, триметилхлорсилан (Merck, ФРГ); триэтиламин (Fluka, Швейцария); флуоресцеинизотиоцианат, фосфодиэстеразу змеиного яда и щелочную фосфатазу (Sigma, США); диметокситритилхлорид, искусный ангидрид отечественного производства. бис(N, N-Диизопропиламидо)метилфосфит, этиловый эфир трифторуксусной кислоты и азид лития были получены по методикам [12, 16, 17] соответственно.

Хроматографию в тонком слое осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системах: (K-5) — хлороформ — этанол (95 : 5), (K-10) — хлороформ — этанол (9 : 1). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле марки Silicagel L40/100 (Chemapol, Чехо-Словакия).

Олигонуклеотидный синтез выполняли на автоматических ген-синтезаторах «Виктория-4М» производства СКТБ специальной электроники и аналитического приборостроения СО РАН, а также Applied Biosystems 380В (США). В качестве полимерного носителя использовали Small Scale dN CPG (Applied Biosystems, США) с загрузкой первым нуклеозидным звеном 20—24 мкмоль/г.

¹H-ЯМР-Спектры записывали на приборе VXR-400 (Varian, США). УФ-спектры и кривые температурной зависимости УФ-поглощения регистрировали на спектрофотометре 150-20 (Hitachi, Япония) в термостатированной кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см; концентрацию олигонуклеотидов измеряли спектрофотометрически; за коэффициент молярного поглощения олигонуклеотидов принимали сумму коэффициентов составляющих мононуклеотидов. Использовали эквимольные смеси компонентов. ИК-спектры записывали на спектрофотометре UR-20 (Germany). КД-спектры регистрировали на приборе Jasco J 500С (Япония) при комнатной температуре.

5'-О-Диметокситритил-2'-трифторацетамидо-2'-деокси-3'-(N, N-диизопропиламидо) метилфосфит уридина получали из уридина как описано нами в работе [9].

5'-О-Диметокситритил-N⁴-бензоилцитидин (1) синтезировали по стандартным методикам [18].

5'-О-Диметокситритил-N⁴-бензоил-2'-азидо-2'-деоксицитидин (3). К раствору 5,2 г (8 ммоль) соединения (1) в 120 мл смеси растворителей диметилформамид — диоксан (1 : 1) добавляли каталитическое количество NaHCO₃ и 2,1 г (19 ммоль) дифенилкарбоната, кипятили 1,5—2 ч. Образование продукта циклизации (2) регистрировали ТСХ (R_f соединения (2) в системе (K-10) 0,36). К реакционной смеси добавляли 2,75 г (56 ммоль) азид лития и кипятили 2 ч; полноту прохождения реакции контролировали ТСХ. Реакционную смесь упаривали до масла, растворяли в 250 мл хлороформа, промывали водой (3×150 мл). Объединенные органические вытяжки высушивали Na₂SO₄, концентрировали

и осаждали в 1 л пентана, полученный осадок отфильтровывали, растворяли в 30 мл хлороформа и хроматографировали на колонке с силикагелем в градиенте концентрации (0—3%) этанола в хлороформе.

Получили два вещества. Соединение (3) — выход 23%, R_f 0,66 (К-10); УФ-спектр (EtOH, нм): λ_{\max} 308,4; 241,2; плечо 260; λ_{\min} 292,4; ИК-спектр (KBr, ν , см^{-1}): 2120 (N_3), 1666, 1616 (C=O); ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 5,36 (д, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ 0,8 Гц), 4,33 (ушир.д, 1H, H-2', $J_{2',3'}$ 6,6 Гц), 4,50 (м, 1H, H-3'), 4,06 (дт, 1H, H-4', $J_{3',4'}$ 8,74 Гц), 3,54 (дд, 1H, H-5'a, $J_{5'a,5'b}$ 11,4 Гц, $J_{4',5'a}$ 2,6 Гц), 3,64 (дд, 1H, H-5'b, $J_{4',5'b}$ 2,5 Гц), 2,56 (ушир.с, 3'-OH).

Соединение (3а) — выход 20%, R_f 0,88 (К-10); УФ-спектр (EtOH, нм): λ_{\max} 308,0; 240,4; плечо 260; λ_{\min} 295,2; ИК-спектр (KBr, ν , см^{-1}): 2120 (N_3), 1667, 1616, 1724 (C=O); ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 6,11 (д, 1H, H-1', $J_{1',2'}$ 2,04 Гц), 4,62 (дд, 1H, H-2', $J_{2',3'}$ 5,25 Гц), 5,51 (дд, 1H, H-3', $J_{3',4'}$ 8,1 Гц), 4,45 (м, 1H, H-4'), 3,23 (дд, 1H, H-5'a, $J_{5'a,5'b}$ 11,6 Гц, $J_{4',5'a}$ 2,5 Гц), 3,8 (дд, 1H, H-5'b, $J_{4',5'b}$ 2,5 Гц).

5'-О-Диметокситритил- N^4 -бензоил-2'-трифторацетамидо-2'-дезоксцитидин (5). 1,24 г (1,84 ммоль) соединения (3) сушили переупариванием в вакууме с абс. пиридином (3×10 мл), растворяли в 18,5 мл абс. пиридина и добавляли 0,78 г (3 ммоль) трифенилфосфина. Реакционную смесь перемешивали 1,5 ч на магнитной мешалке при 20° С. Полноту прохождения реакции контролировали ТСХ. К реакционной смеси добавляли 3,7 мл конц. водного аммиака и перемешивали еще 1 ч, затем упаривали до масла, растворяли в 100 мл хлороформа, промывали водой (3×50 мл). Объединенные органические вытяжки высушивали Na_2SO_4 и концентрировали. R_f соединения (4) в системе (К-10) 0,26. Соединение (4) без хроматографической очистки высушивали переупариванием в вакууме с абс. пиридином (3×3 мл), растворяли в 9 мл смеси хлористого метилена и абс. пиридина (1 : 1), добавляли 0,4 мл (3,68 ммоль) этилового эфира трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь выдерживали 24 ч при 20° С (ТСХ-контроль), затем упаривали до масла, растворяли в 100 мл хлороформа, промывали водой (3×50 мл). Органические вытяжки высушивали Na_2SO_4 , концентрировали и хроматографировали на колонке с силикагелем в градиенте концентрации (0—5%) этанола в хлороформе; выход соединения (5) 68%, R_f 0,5 (К-5); ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 8,45 (д, H-1, NH-2', $J_{2'-\text{NH}}$ 5,6 Гц).

5'-О-Диметокситритил- N^4 -бензоил-2'-трифторацетамидо-2'-дезоксци-3'-(N , N -диизопропиламино)метилфосфит цитидина (6) получали аналогично [12].

Защитные группы после синтеза олигонуклеотидов удаляли как описано нами ранее [7].

Анализ реакционных смесей и выделение олигонуклеотидов осуществляли с использованием хроматографических колонок размером 4×250 мм; носитель — Диасорб С16Т (7 мкм, «ЭЛСИКО», Россия). Обращенно-фазовую хроматографию олигонуклеотидов, содержащих диметокситритильную группу, осуществляли на хроматографе Altex (США) в градиенте концентрации (0—40%) ацетонитрила за 60 мин в 0,1 М ацетате аммония, рН 6,5 (скорость элюции 1 мл/мин, 45° С).

После удаления диметокситритильной группы олигонуклеотиды анализировали повторно обращенно-фазовой и ион-парной ВЭЖХ. Обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на хроматографе Трасог (Голландия) в градиенте концентрации (0—40%) ацетонитрила за 80 мин в 0,1 М ацетате аммония, рН 6,5 (скорость элюции 1 мл/мин, 45° С). Ион-парную хроматографию осуществляли на приборе Waters (США) в градиенте концентрации (5—40%) ацетонитрила в 48 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7) в присутствии 2 мМ дигидрофосфата тетрабутиламмония (скорость элюции 1 мл/мин, 45° С).

Чтобы определить нуклеозидный состав, 0,2 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида растворяли

в 8 мкл 0,2 М трис-НСl-буфере, содержащего 0,04 М MgCl₂ (рН 8,5), добавляли 1 мкл щелочной фосфатазы (0,26·10⁻³ ед. акт./мкл) и 1 мкл фосфодиэстеразы змеиного яда (0,48·10⁻² ед. акт./мкл). Реакционную смесь инкубировали 3 ч при 37° С. Продукт гидролиза анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Altex (США) в градиенте концентрации (0—12%) ацетонитрила за 40 мин в 0,1 М ацетате аммония, рН 6,5 (скорость элюции 1 мл/мин, 45° С).

FITC-производные олигонуклеотидов (I) и (III) получали по методике [19] с последующим их осаждением ацетоном из 2 М раствора перхлората лития. Продукты реакции выделяли методом гель-фильтрации на полимерном носителе Toyorearl HW-40-Gel (Япония). Выделенные FITC-производные олигонуклеотидов (I) и (III) анализировали обращенно-фазовой и ион-парной ВЭЖХ.

Ацилирование олигонуклеотидов (I) и (III). К раствору 1,0 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида в 200 мкл боратного буфера (рН 8,58) добавляли 50 мкл уксусного ангидрида и выдерживали 1 ч при 20° С, периодически встряхивая. Продукты реакции выделяли и обессоливали методом гель-фильтрации на полимерном носителе Toyorearl HW-40-Gel (Япония). Реакционные смеси анализировали обращенно-фазовой и ион-парной ВЭЖХ (условия см. выше).

Для *гибридазного расщепления РНК* 0,001—0,002 ОЕ₂₆₀ 5'-³²P-5S рНК (50 000 имп/мин) и 0,01—0,05 ОЕ₂₆₀ олигодезоксирибонуклеотида растворяли в 5 мкл 0,01 М буфера трис-НСl, рН 7,9, содержащего 0,15 М NaCl, 10 мМ MgCl₂, 0,5 мМ дитиотреит, 0,1 мМ EDTA, добавляли 1 мкл РНКазы Н, перемешивали, выдерживали 30 мин при 20° С. Продукты гидролиза разделяли в 15 или 20% ПААГ, зоны вырезали, количество радиоактивной метки определяли просчитыванием проб на счетчике Delta-300 (Varian, США).

Авторы выражают благодарность Н. П. Потаповой (ВНИИ по изысканию новых антибиотиков РАМН) за помощь при интерпретации ЯМР-спектров и В. Н. Сергееву (химический факультет МГУ) за проведение анализа нуклеотидной последовательности модифицированных олигонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coull J. M., Weith H. L., Bischoff R. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 34. P. 3991—3994.
2. Li P., Medon P. P., Skingle D. C., Lanser J. A., Symons R. H. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. № 17. P. 5275—5281.
3. Roger A., Bazin H., Teoule R. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. № 19. P. 7643—7651.
4. Волков Е. М., Кубарева Е. А., Таулицкий В. Н., Орецкая Т. С. // *Химия природ. соедин.* 1991. № 5. С. 698—704.
5. Agrawal S., ZamecniĀ P. C. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. № 18. P. 5419—5423.
6. Metelev V. G., Krynetskaya N. F., Pурmal A. A., Шабарова З. А., Точик З., Arnold L., Smrt J. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1990. V. 55. P. 2781—2786.
7. Шмидт С., Кузнецова Л. Г., Романова Е. А., Ниманн А., Орецкая Т. С., Крынецкая Н. Ф., Метелев В. Г., Шабарова З. А. // *Биоорган. химия.* 1991. Т. 17. № 6. С. 823—830.
8. Pieken W. A., Olsen D. B., Benseler F., Aurig H., Eckstein F. // *Science.* 1991. V. 253. P. 314—317.
9. Кузнецова Л. Г., Волков Е. М., Романова Е. А., Таулицкий В. Н., Орецкая Т. С., Шабарова З. А. // *Биоорган. химия.* 1991. Т. 17. № 9. С. 1289—1291.
10. Hampton A., Nichol A. W. // *Biochemistry.* 1966. V. 5. № 6. P. 2076—2082.
11. Verheyden J. P. H., Wagner P., Moffatt J. G. // *J. Org. Chem.* 1971. V. 36. № 2. P. 250—254.
12. Barone A. P., Tang J. U., Caruthers M. N. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 10. P. 4051—4061.
13. Krug A., Schmidt S., Lekschas J., Lemke K., Cech D. // *J. Pract. Chem.* 1989. V. 331. S. 835—842.
14. Maxam A. M., Gilbert W. // *Meth. Enzymol.* 1980. V. 65. P. 499—560.
15. Шабарова З. А., Вейко В. П., Долинная Н. Г., Друца В. Л., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Пурмаль А. А. // *Биоорган. химия.* 1987. Т. 13. № 5. С. 628—642.

16. Гудлицкий М. Химия органических соединений фтора. М.: ГХИ, 1961. С. 134, 174—175.
17. Бауэр Г. Руководство по неорганическому синтезу. М.: Мир, 1985. Т. 2. С. 496—497.
18. Jones R. F.//Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach/Ed. Gait M. J. Oxford: Washington P. C. J. R. L. Press, 1984.
19. Agrawal S., Christodoulou C., Gait M. J.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 15. P. 6227—6245.

Поступила в редакцию
15.VI.1992

*L. G. Kuznetsova, E. A. Romanova, E. M. Volkov, V. N. Tashlitsky,
T. S. Oretskaya, N. F. Krynetskaya, Z. A. Shabarova*

OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES CONTAINING 2'-AMINO-2'-DEOXYPYRIMIDINE NUCLEOSIDES

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

The synthesis, by means of the standard phosphoramidite chemistry, of modified oligodeoxynucleotides (5—20 residues) containing 2'-amino-2'-deoxyuracil nucleosides has been carried out, and their ability to form duplexes with complementary DNA has been investigated. A high reactivity of such compounds in N-acylation was shown.