



УДК 547.963 : 543.422.25

СИНТЕЗ 5'-ТРИФОСФАТОВ ДЕЗОКСИОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ  
И ИХ ПРЕВРАЩЕНИЕ В  $\gamma$ -АМИДЫ

Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н.

Институт органической химии Академии наук СССР  
Сибирского отделения, Новосибирск

На примере получения  $d(\text{pppTrTrTrT})$  и  $d(\text{pppTrTrTrCrC})$  разработан метод синтеза 5'-трифосфатов олигодезоксирибонуклеотидов, основанный на активации концевого 5'-фосфата переводом его в смешанный ангидрид мезитиленкарбонической кислоты, реакции смешанного ангидрида с морфолином и последующей обработке 5'-морфолида теоретическим пирофосфатом. Изучена активация 5'-трифосфатов олигонуклеотидов в DMSO в присутствии DCC и добавок солянокислого авинина или хлористого пиридина. Методом  $^{31}\text{P}$ -ЯМР зарегистрировано образование активированного производного — 5'-триметафосфата олигонуклеотида. При обработке активированных производных олигонуклеотидов АВМА в смеси DMSO с метанолом получены  $\gamma$ -N-(*n*-амфинобензил)-N-метиламиды соответствующих олигонуклеотидов с выходом ~ 80%. Проведена активация  $d(\text{pppTrTrTrCrC})$  в водном растворе, pH 6, в присутствии *n*-толуолсульфоната N-циклогексил-N'-(2-метилморфолиний)этилкарбодимида. Последующая обработка активированного производного  $d(\text{pppTrTrTrCrC})$  АВМА приводит к синтезу  $\gamma$ -(*n*-метиламинометил)-амида с выходом 60%. Синтезированные  $\gamma$ -амиды 5'-трифосфатов олигонуклеотидов охарактеризованы данными МКХ в системе Томлинсона — Тенера, УФ-спектрами и по продуктам кислотного гидролиза.

Недавно было показано, что образующееся при действии дициклогексилкарбодимида на АТР производное, представляющее собой аденозин-5'-триметафосфат [1], практически количественно реагирует с аминами с образованием соответствующих амидов по  $\gamma$ -фосфатному остатку [2]. Несколько ранее такая реакция была осуществлена в водном растворе с использованием *n*-толуолсульфоната N-циклогексил-N'-(2-метилморфолиний)этилкарбодимида [3]. Представляло интерес выяснить возможность проведения аналогичной реакции по трифосфатной группе, находящейся на 5'-конце олигонуклеотида. Ее осуществление дало бы простой способ получения производных олигонуклеотидов по 5'-концевой группе в качестве реагентов для аффинной модификации белков и нуклеопротеидов, специфичных к олигонуклеотидам определенной последовательности, и для комплементарно адресованной модификации нуклеиновых кислот [4]. Кроме того, селективная реакция по 5'-трифосфатной группе олиго- и полинуклеотидов может оказаться полезной для получения производных транскриптов, полученных с помощью РНК-полимеразы, поскольку известно, что первичные продукты транскрипции содержат такую группу [5].

Сокращения: MsCOCl — хлорангидрид 2,4,6-триметил-бензойной (мезитиленкарбонической) кислоты; АВМА — N-(*n*-аминобензил)-N-метиламин; DMSO — диметилсульфоксид; DCC — дициклогексилкарбодимид; МКХ — микроколоночная хроматография. Остальные сокращения приведены в соответствии с рекомендацией IUPAC — IUB (1971), J. Mol. Biol., 55, 299.

В связи с этим нами был разработан метод синтеза 5'-трифосфатов олигонуклеотидов, исследована возможность проведения активации трифосфатной группы, находящейся на 5'-конце олигонуклеотидной цепи, а также возможность использования активных производных для получения амидов по  $\gamma$ -фосфату этой группы. Так как в настоящее время отсутствуют удовлетворительные методы превращения концевой фосфомоноэфирной группы олигонуклеотида в трифосфатную [6], мы предложили использовать для этих целей активацию концевого 5'-фосфата олигонуклеотида переводом его в смешанный ангидрид мезитиленкарбоновой кислоты. Этот прием описан в работе [7] и положен в основу метода синтеза амидов олигонуклеотидов З. А. Шабаровой и сотр. [8]. Преимущества использования стерически затрудненного хлорангидрида мезитиленкарбоновой кислоты для активации концевых фосфатных групп в олигонуклеотидах подробно обсуждены в работе [8]. Последовательность реакций, приводящих к превращению концевого 5'-фосфата олигонуклеотида в 5'-трифосфат, схематически можно изобразить следующим образом:  $\text{MsCOCl} + \text{pN}(\text{pN})_n \rightarrow (\text{MsCO})\text{pN}(\text{pN})_n \xrightarrow{\text{NH}_2\text{R}} \text{RNHPN}(\text{pN})_n \xrightarrow{\text{pp}} \text{pppN}(\text{pN})_n$ .

В качестве модельных олигонуклеотидов для исследования реакций были использованы три- и пентануклеотиды  $d(\text{pTrTrT})$  и  $d(\text{pTrTrTrCrC})$ . Взаимодействие хлорангидрида мезитиленкарбоновой кислоты с 5'-фосфатом олигонуклеотида проводили как предложено в работе [8]. 5'-Морфолиды олигонуклеотидов получали как в водно-пиридиновом растворе, так и в абсолютном диметилформамиде.

Проведение реакции в диметилформамиде значительно сокращает время образования соответствующего морфолида, позволяет работать с три-*n*-алкиламмониевыми солями олигонуклеотидов (где алкил — *n*-бутил, *n*-октил), использование которых необходимо на последующих стадиях, протекающих в абсолютных органических растворителях, и дает возможность работать с лабильными в щелочных средах олигорибонуклеотидами. Смешанные ангидриды и 5'-морфолиды олигонуклеотидов были получены с количественным выходом и охарактеризованы с помощью фосфодиэстеразы змеиного яда (см. «Экспериментальную часть»). Превращение 5'-морфолидов олигонуклеотидов в соответствующие 5'-трифосфаты осуществляли по методу, описанному в работе [9]. Выходы продуктов реакции достигают ~ 75% в случае тринуклеотида и ~ 65% в случае пентануклеотида. При этом реакционные смеси почти не содержат исходных веществ. Основными побочными продуктами реакции являются соответствующие олигонуклеотиды, образующиеся в результате гидролиза исходных 5'-морфолидов. Кроме того, в реакционных смесях присутствуют в небольших количествах 5'-дифосфаты олигонуклеотидов — продукты деградации 5'-трифосфатов. Очевидно, для того чтобы свести эти побочные процессы к минимуму, необходимо тщательное высушивание реагентов и растворителей. Превращение 5'-морфолидов олигонуклеотидов в 5'-трифосфаты осуществляли в присутствии высоких концентраций неорганического пирофосфата (см. «Экспериментальную часть»). Было замечено, что при низких концентрациях последнего возрастает выход продуктов гидролиза исходных морфолидов.

Выделение синтезированных 5'-трифосфатов олигонуклеотидов проводили хроматографией реакционной смеси на DEAE-целлюлозе в  $\text{HCO}_3^-$ -форме; иногда требуется предварительное удаление избытка пирофосфата гель-фильтрацией на сефадексе G-15. Профили хроматографических разделений реакционных смесей при выделении  $d(\text{pppTrTrT})$  и  $d(\text{pppTrTrTrCrC})$  приведены на рис. 1, 2.

Выделенные 5'-трифосфаты три- и пентануклеотида охарактеризованы анализом продуктов неполного гидролиза фосфомоноэстеразой. В обоих случаях при хроматографии гидролизата в системе Томлинсона — Тенера в микромасштабе [10] обнаружены четыре пика, соответствующих про-

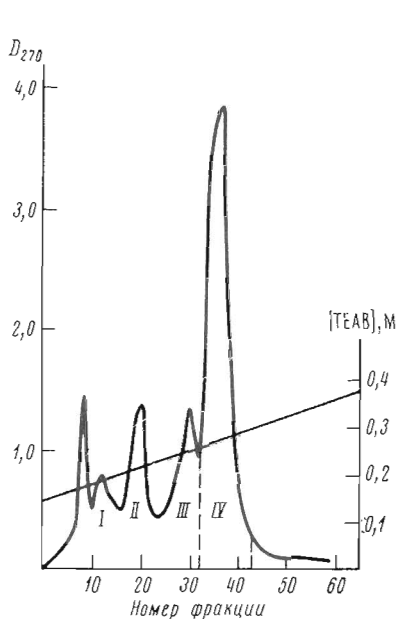


Рис. 1

Рис. 1. Хроматографическое выделение  $d(pppTrpTrp)$  на колонке ( $35 \times 3$  см) с DEAE-целлюлозой ( $HCO_3^-$ ) в градиенте бикарбоната триэтиламмония (0,15—0,35 M), pH 8, в 10%-ном этаноле. Объем градиента 1,5 л, скорость элюции 100 мл/ч. Пик I — 5'-морфолид  $d(pTrpTrp)$ ; пик II —  $d(pTrpTrp)$ ; пик III —  $d(ppTrpTrp)$ ; пик IV —  $d(pppTrpTrp)$

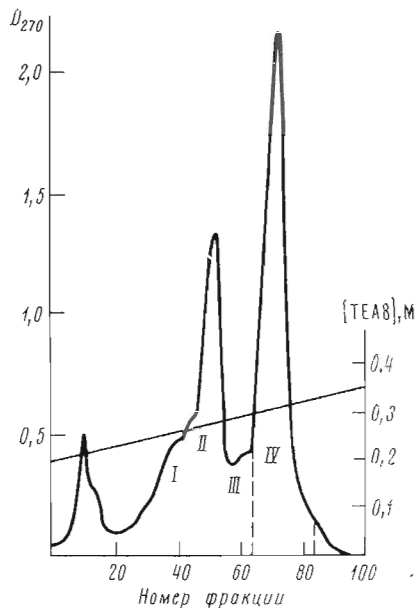
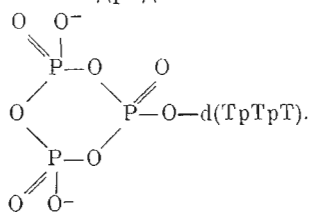


Рис. 2

Рис. 2. Хроматографическое выделение  $d(pppTrpTrpTrpCrC)$  на колонке ( $20 \times 1,2$  см) с DEAE-целлюлозой ( $HCO_3^-$ ) в градиенте бикарбоната триэтиламмония (0,2—0,4 M), pH 8, в 20%-ном этаноле. Объем градиента 700 мл, скорость элюции 30 мл/ч. Пик I не идентифицирован; пик II —  $d(pTrpTrpTrpCrC)$ ; пик III —  $d(ppTrpTrpTrpCrC)$ ; пик IV —  $d(pppTrpTrpTrpCrC)$

дуктам последовательного дефосфорилирования. На рис. 3, а приведен спектр  $^{31}P$ -ЯМР  $d(pppTrpTrp)$ . В спектре зарегистрированы два синглета с  $\delta$  3,0 и 3,2 м.д., соответствующие двум межнуклеотидным атомам фосфора; два дублета ( $J_{P-O-P}$  19,5 Гц) при 11,2 и 12,2 м.д., отвечающие  $\gamma$ - и  $\alpha$ -атомам фосфора в трифосфатной группировке, и триплет ( $J_{P-O-P}$  19,5 Гц) с центром при 23,4 м.д., соответствующий  $\beta$ -атому фосфора 5'-трифосфата. Относительные интенсивности сигналов хорошо согласуются с ожидаемыми для структуры полученного соединения.

Активацию синтезированных 5'-трифосфатов олигонуклеотидов проводили в DMSO в присутствии DCC, используя данные работ [1, 2]. Реакцию ускоряли добавлением солянокислого анилина или хлористого пиридина. Превращение 5'-трифосфата олигонуклеотида в активированное производное наблюдали на примере  $d(pppTrpTrp)$  по изменению спектра  $^{31}P$ -ЯМР (см. рис. 3, б). Примерно через 1 ч после добавления хлоргидрата анилина в спектре регистрируется только мультиплет при 24 м.д. и два синглета, соответствующие межнуклеотидным атомам фосфора ( $\delta$  3,0 и 3,2 м.д.). Положение мультиплета свидетельствует об образовании циклической структуры с ангидридными атомами фосфора.



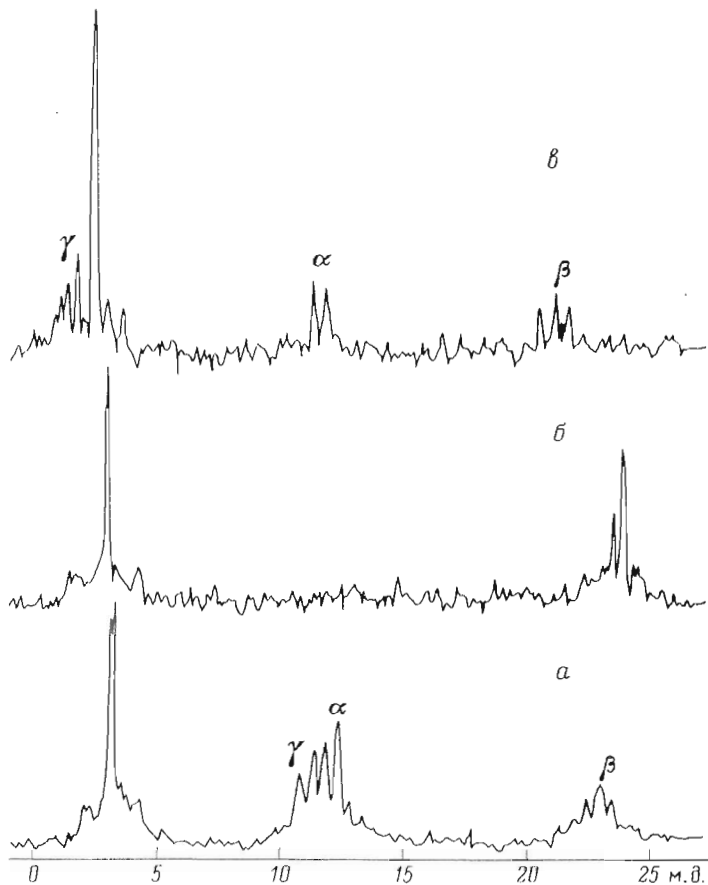


Рис. 3. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР: а —  $d(\text{pppTrpTrpT})$  в DMSO, б —  $d(\text{pppTrpTrpT}) + \text{DCC} + \text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$  (спектр записан через 3 ч), в —  $\gamma$ -амид(I) в смеси DMSO — метанол (3 : 1)

Никаких реакций по межнуклеотидным атомам фосфора замечено не было. Отношение интенсивностей сигналов соответствует ожидаемому, т. е. превращение трифосфата в активированное производное, по данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, количественное. В качестве контроля за ходом активации 5'-трифосфатов олигонуклеотидов удобно использовать реакцию активированных производных с избытком водного раствора этилендиамина (рН 6). Образующийся в этих условиях  $\gamma$ -амид содержит на два отрицательных заряда меньше, чем исходный 5'-трифосфат олигонуклеотида, и может быть легко обнаружен микроколоночной ионообменной хроматографией, что особенно важно при работе с достаточно длинными олигонуклеотидами.

Фосфорилирующие свойства активированных производных 5'-трифосфатов олигонуклеотидов были проверены в условиях работы [2] с использованием АВМА.

При добавлении к активированным производным в DMSO метанольного раствора АВМА реакция проходит по более основной алифатической аминогруппе с образованием соответствующих  $\gamma$ -амидов. На рис. 3, в приведен  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектр  $N$ -( $n$ -аминобензил)- $N$ -метиламида  $d(\text{pppTrpTrpT})$  (I), отличающийся от спектра исходного 5'-трифосфата смещением дублета  $\gamma$ -фосфора на 9,3 м.д. в слабое поле. При анализе реакционных смесей с помощью МКХ в системе Томлинсона — Генера для обоих изучаемых 5'-трифосфатов обнаруживали помимо основного продукта,  $\gamma$ -амида (I) или (II), 15—20% примеси — предположительно  $\beta$ -амидов 5'-дифосфатов соответствующих олигонуклеотидов (см. рис. 4, а, 5, а).  $\beta$ -Амиды имеют

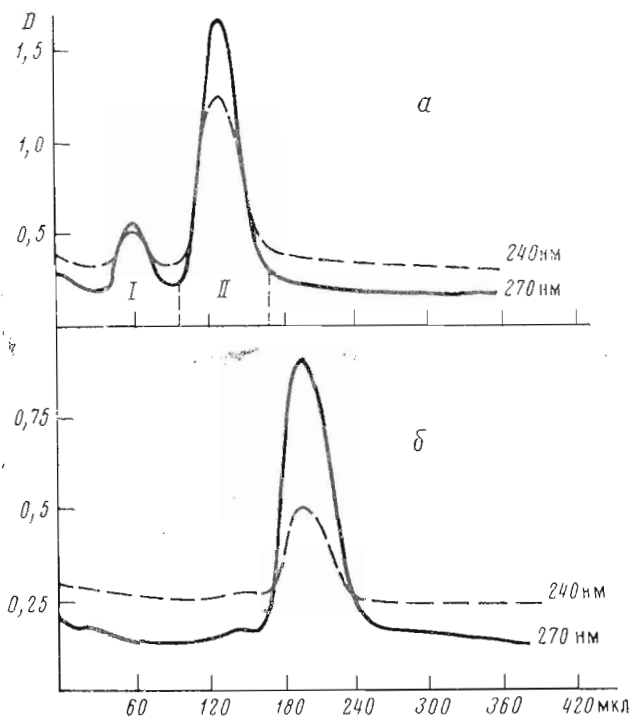


Рис. 4. МКХ в системе Томлинсона — Генера (рН 8), 0,02 → 0,18 М NaCl, 480 мкл: *a* — реакционной смеси при синтезе  $\gamma$ -амида (I): I —  $\beta$ -амид d(ppTrTrTrT), II —  $\gamma$ -амид(I); *b* — кислотного гидролизата  $\gamma$ -амида(I) (пик II, рис. 4, *a*)

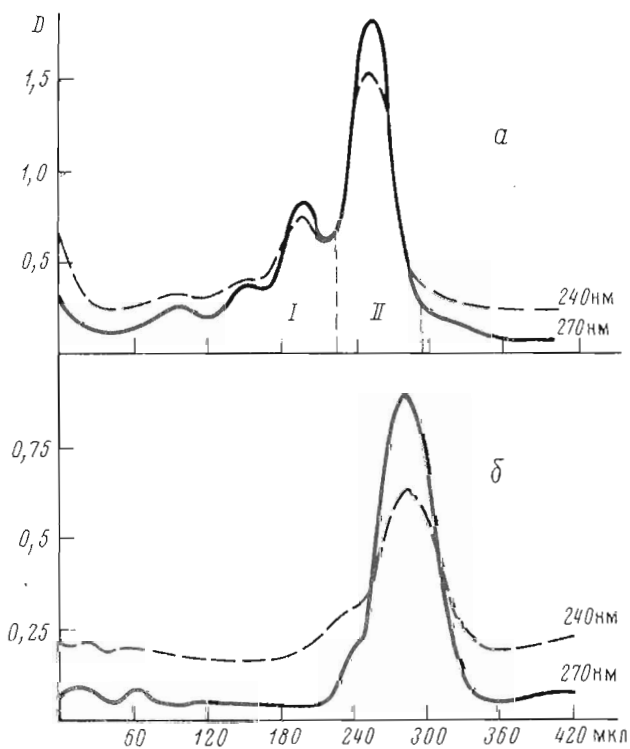


Рис. 5. МКХ в системе Томлинсона — Генера (рН 8), 0,02 → 0,18 М NaCl, 480 мкл: *a* — реакционной смеси при синтезе  $\gamma$ -амида(II): I —  $\beta$ -амид d(ppTrTrTrTrC), II —  $\gamma$ -амид(II); *b* — кислотного гидролизата  $\gamma$ -амида (II) (пик II, рис. 5, *a*)

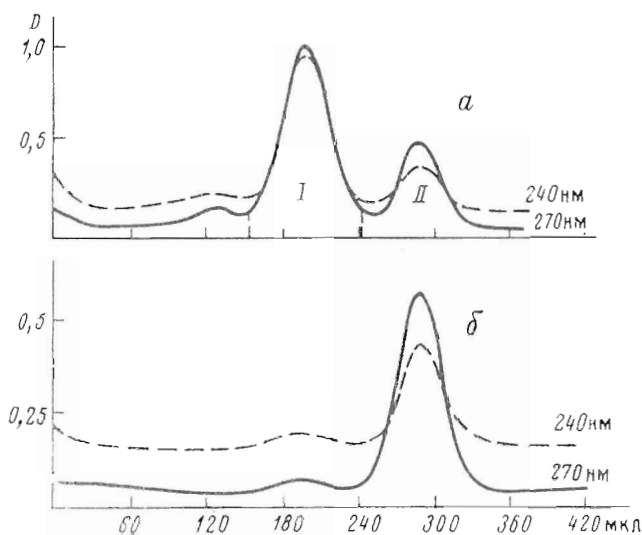


Рис. 6. МУХ в системе Томлинсона — Тенера (рН 8), 0,02 → 0,18 М NaCl, 480 мкЛ: *a* — реакционной смеси при синтезе  $\gamma$ -амида (IV): *I* —  $\gamma$ -амид (IV), *II* —  $d(\text{pppTrTrTrCrC})$ ; *b* — кислотного гидролизата  $\gamma$ -амида (IV) (пик 1, рис. 6, *a*)

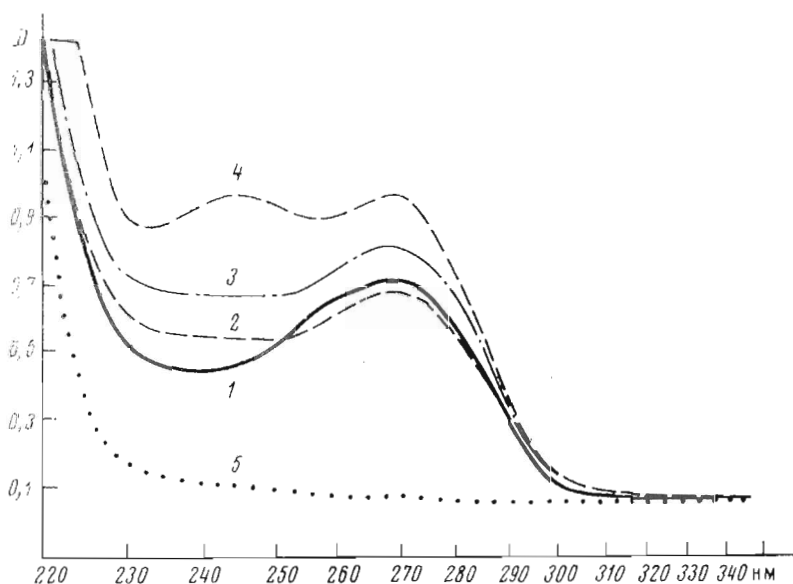


Рис. 7. УФ-спектры поглощения в 7 М мочеvine, рН 8: *1* —  $d(\text{pppTrTrTrCrC})$ , *2* —  $\beta$ -амид  $d(\text{ppTrTrTrTrCrC})$  (пик 1, рис. 5, *a*), *3* —  $\gamma$ -амид (II), *4* —  $\gamma$ -амид (IV), *5* — 7М мочеvина, рН 8

строение, аналогичное строению  $\gamma$ -амидов (I) и (II), о чем свидетельствует заряд соединения, а также спектральное отношение  $D_{240}/D_{270}$ , характерное для амидов, образованных с участием алифатической  $\text{NH}_2$ -группы (см. «Экспериментальную часть»).

Наличие в молекуле АВМА двух  $\text{NH}_2$ -групп разной основности делает возможным получение в определенных условиях  $\gamma$ -амидов избирательно по алифатической или ароматической аминогруппам. При проведении активации  $d(\text{pppTrTrTrCrC})$  в водном растворе (рН 6) в присутствии *n*-толуолсульфоната *N*-циклогексил-*N'*-(2-метилморфолиний)этилкарбодиимида [11] и последующей обработке активированного производного при

том же рН АВМА образуется замещенный  $\gamma$ -анилид 5'-трифосфата пентануклеотида (IV). По данным МКХ в системе Томлинсона — Тенера, содержание его в реакционной смеси  $\sim 60\%$  (см. рис. 6, а). Синтезированный анилид имеет характерное спектральное отношение  $D_{240}/D_{270}$ , равное 0,92 и указывающее на участие в образовании амидной связи ароматической  $\text{NH}_2$ -группы.

$\gamma$ -Амиды 5'-трифосфатов олигонуклеотидов были выделены в индивидуальном состоянии при хроматографическом разделении реакционных смесей на ДЕАЕ-целлюлозе в  $\text{Cl}^-$ -форме в системе Томлинсона — Тенера. УФ-спектры  $\gamma$ -амидов, полученных из пентануклеотида, приведены на рис. 7. Кислотный гидролиз полученных в работе  $\gamma$ -амидов, приводит к количественному освобождению исходных 5'-трифосфатов олигонуклеотидов (см. рис. 4, б, 5, б, 6, б).

Разработанный метод синтеза 5'-трифосфатов олигонуклеотидов, последующая активация 5'-трифосфатной группировки в присутствии карбодимидов и взаимодействие активированных производных с нуклеофильными реагентами открывают большие перспективы для получения производных олигонуклеотидов, замещенных по  $\gamma$ -фосфату. Возможность проведения реакции в водных растворах или неводных средах позволяет использовать полинуклеотиды большой длины и применять реагенты, содержащие лабильные в водных растворах группировки. 5'-Трифосфаты олигонуклеотидов могут быть легко получены с введенной радиоактивной меткой при использовании для обработки соответствующих 5'-морфолидов меченного по фосфору неорганического пирофосфата.

### Экспериментальная часть

Использованные в работе олигонуклеотиды синтезированы согласно [12] из 2'-дезоксидеокси-5'-нуклеотидов и N-ацилдезоксинуклеотидов производства Опытного химического цеха НИОХ СО АН СССР. Строение синтезированных олигонуклеотидов подтверждено с помощью гидролиза фосфодиэстеразой, МКХ в системе Томлинсона — Тенера и УФ-спектрами. Дидецилгексилкарбодимид и *n*-толуолсульфонат N-циклогексил-N'-(2-метилморфолиний)этилкарбодимиды получены в группе наработки НИОХ. Хлорангидрид мезитиленкарбоновой кислоты получали как описано в работе [13]. N-(*n*-Аминобензил)-N-метиламин предоставлен В. А. Курбатовым (НИОХ). В работе использовали сухие растворители: пиридин (содержание влаги не более 0,02%), диметилсульфоксид (содержание влаги не более 0,05%). МКХ проводили на колонках  $5 \times 0,08$  см с ДЕАЕ-целлюлозой TLC фирмы «Serva» (ФРГ) в  $\text{Cl}^-$ -форме, градиент концентрации  $\text{NaCl}$  ( $0 \rightarrow 0,18$  М) в 7 М мочеvine, 0,01 М трис- $\text{HCl}$ , рН 8 (объем градиента 500—600 мкл). Регистрацию оптической плотности элюата в потоке осуществляли при помощи разработанного в НИОХ микро-спектрофотометра МСФП-3.

Хроматографию на бумаге Ватман 3 ММ проводили в системе этанол—1М ацетат аммония, 7 : 3 (рН 7,5).

Для аналитических целей использовали щелочную фосфатазу *E. coli* (Worthington, США) и фосфодиэстеразу яда гюрзы, предоставленную Г. Т. Бабкиной (НИОХ).

Условия ферментативного гидролиза см. ниже.

Препаративную хроматографию проводили на смоле «Servacell» DE 52 («Serva»).

УФ-спектры снимали на приборе «Specord» (ГДР).

Спектры ЯМР на ядрах  $^{31}\text{P}$  записаны на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразователем на ЭВМ В-НС 12 («Bruker — Physik AG», ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены относительно  $\text{H}_3\text{PO}_4$  как внешнего стандарта. Диаметр ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,5 мл.

Количественную оценку результатов проводили по интегральным кривым, принимая за 100% сумму интегралов по всему спектру, точность интегрирования  $\pm 10\%$ .

$d[(MsCO)pTpTpT]$ . 110 мг триэтиламмониевой соли  $d(pTpTpT)$  (1650  $OE_{270}$ ) растворяли в 5 мл абсолютного пиридина и упаривали до 3 мл. К раствору добавляли 0,2 мл мезитиленкарбонилхлорида. Через 30 мин ( $25^\circ$ ) к смеси приливали 4 мл воды. После экстракции эфиром ( $5 \times 2$  мл) для удаления избытка хлорангидрида и пиридина водный слой упаривали досуха, периодически добавляя *n*-бутанол. Выход продукта количественный по данным БХ. Содержание основного вещества 96% по данным МКХ (регистрация при  $\lambda$  270, контроль  $d(pTpTpT)$ ). Продукт количественно гидролизуются фосфодиэстеразой (10 ед. активности на 1  $OE_{270}$  0,05M  $MgCl_2$ ; 0,05M трис-HCl, pH 8,5; общий объем 0,2 мл;  $40^\circ$ ).

$d[(MsCO)pTpTpTpCpC]$  получен аналогично описанному для три-нуклеотида: 24 мг три-*n*-октиламмониевой соли  $d(pTpTpTpCpC)$  (240  $OE_{270}$ ), 0,3 мл абсолютного пиридина, 0,03 мл  $MsCOCl$ . Выход 97% по данным МКХ (регистрация при  $\lambda$  270, контроль  $d(pTpTpTpCpC)$ ). Продукт гидролизуются фосфодиэстеразой на 95% (контроль МКХ по  $D_{270}$ ).

5'-Морфолид  $d(pTpTpT)$ . Сухой остаток  $d[(MsCO)-pTpTpT]$  растворяли в 3 мл абсолютного диметилформамида и к раствору приливали 0,3 мл морфолина. Смесь выдерживали 40 ч при  $40^\circ$ . Затем добавляли равный объем воды и после экстракции эфиром ( $3 \times 2$  мл) водный слой упаривали досуха. Выход количественный по данным БХ. Элюат с пятна гидролизуются фосфодиэстеразой и гидролизат анализировали МКХ. Найдено: 5'-морфолид  $dpT$  :  $dpT = 1,0 : 2,08$ .

5'-Морфолид  $d(pTpTpTpCpC)$ . Сухой остаток  $d[(MsCO)pTpTpTpCpC]$  в 1 мл абсолютного диметилформамида и 0,15 мл морфолина выдерживали 48 ч при  $40^\circ$ . В результате гидролиза фосфодиэстеразой синтезированного 5'-морфолида  $d(pTpTpTpCpC)$  получены 5'-морфолид  $dpT$ ,  $dpT$ ,  $dpC$  в отношении 0,85 : 2,15 : 2.

Бис(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфат. 1,33 г (5 ммоль) прокаленного  $Na_4P_2O_7$  растворяли в 100 мл воды и пропускали через колонку с 80 мл дауэкса  $50 \times 2$  в  $H^+$ -форме. Смолу отмывали водой до pH 6. К элюату добавляли 2,5 мл три-*n*-бутиламина (10 ммоль) и 20 мл *n*-бутанола. Раствор упаривали до густого сиропа и остаток высушивали азеотропной отгонкой с абсолютным пиридином ( $3 \times 5$  мл) и затем с абсолютным бензолом ( $3 \times 5$  мл). Остаток растворяли в 9 мл абсолютного DMSO, перегнанного в вакууме и высушенного над молекулярными ситами типа 4A. Концентрация раствора 0,52 M. Содержание ортофосфата не более 4% (по данным спектроскопии  $^{31}P$ -ЯМР).

Бис(три-*n*-октиламмоний)пирофосфат приготовили аналогично.

$d(pppTpTpT)$ . Полученный из 110  $\mu$ г  $d(pTpTpT)$  5'-морфолид высушивали отгонкой с абсолютным пиридином ( $3 \times 1$  мл) и затем с абсолютным бензолом ( $2 \times 1$  мл). К сухому остатку добавляли 1,5 мл 0,52 M раствора бис(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфата в DMSO, затем 0,5 мл абсолютного бензола и реакционную смесь упаривали в вакууме масляного насоса. После выдерживания при комнатной температуре в течение 70 ч к реакционной смеси приливали 3 мл 0,5 M водного бикарбоната триэтиламмония, pH 8. После экстракции 3 мл эфира прозрачный водный раствор наносили на колонку ( $30 \times 1,2$  см) с сефадексом G-15 для удаления избытка пирофосфата. Элюцию проводили 0,05 M бикарбонатом триэтиламмония, pH 8, со скоростью 7 мл/ч. Фракции, поглощающие при 270 нм, объединяли (1350  $OE_{270}$ ), разбавляли до 100 мл водой и наносили на колонку ( $35 \times 3$  см) с DEAE-целлюлозой в  $HCO_3^-$ -форме. Условия хроматографии приведены на рис. 1. Пик IV, содержащий  $d(pppTpTpT)$ , собирали, элюат упаривали с *n*-бутанолом, затем добавляли 10 мл воды и вновь упаривали. Остаток высушивали отгонкой с *n*-бутанолом, растворяли в 5 мл *n*-бутанола и осаждали 100 мл абсолютного эфира. Осадок от-



деляли центрифугированием, промывали эфиром и высушивали в вакууме. Выход 900 ОЕ<sub>270</sub> (55% от d(pTpTpT)). Содержание d(pppTpTpT) в смеси не менее 98% (по данным МКХ). При частичном гидролизе d(pppTpTpT) фосфатазой *E. coli* (0,5 мкл фермента на 0,5 ОЕ<sub>270</sub>; 0,1 М трис-НСl, рН 9; общий объем 0,2 мл; 40 мин; 25°) образуется 4 продукта (анализ с помощью МКХ).

*d(pppTpTpTpCpC)* получали аналогично трифосфату тринуклеотида: 5'-морфолид d(pTpTpTpCpC), полученный из 24 мг d(pTpTpTpCpC), 0,3 мл 0,5 М раствора бис(три-*n*-октиламмоний)пирофосфата в DMSO, 30 ч, 25°. Продукт выделяли хроматографией на колонке (20 × 1,2 см) с DEAE-целлюлозой в HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форме. Условия хроматографии приведены на рис. 2. Пик IV собирали и упаривали. Выход 135 ОЕ<sub>270</sub> (56% от d(pTpTpTpCpC)). Содержание d(pppTpTpTpCpC) не менее 95% (по данным МКХ). При частичном гидролизе d(pppTpTpTpCpC) фосфатазой *E. coli* и с помощью МКХ гидролизата обнаружили 4 пика.

$\gamma$ -*N*-(*n*-Аминобензил)-*N*-метиламид *d(pppTpTpT)* (I). 700 ОЕ<sub>270</sub> сухой триэтиламмониевой соли d(pppTpTpT) растворяли в 1 мл абсолютного DMSO. Раствор высушивали упариванием с абсолютным пиридином (0,2 мл) и помещали в ампулу ЯМР-спектрометра. После записи спектра <sup>31</sup>P-ЯМР исходного раствора (рис. 3, а) добавляли 0,2 мл раствора DCC в абсолютном DMSO (1 ммоль/1 мл). Через 3 ч были отмечены следы образовавшегося 5'-триметафосфата олигонуклеотида. Добавляли 10 мг солянокислого анилина и через 3 ч записывали спектр (рис. 3, б). Образование активированного производного количественное. К смеси добавляли 0,4 мл метанольного раствора *N*-(*n*-аминобензил)-*N*-метиламина (1 ммоль/мл) и через 2 ч записывали спектр (рис. 3, в). Содержимое ампулы, стараясь не захватывать осадок дициклогексилмочевины, переносили в центрифужную пробирку с 20 мл раствора NaI в абсолютном ацетоне (30 мг/мл). Осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном и высушивали в вакууме. Выход 620 ОЕ<sub>270</sub> (около 85%). Содержание  $\gamma$ -амида (I) 80%,  $D_{240}/D_{270} = 0,55$ ; содержание  $\beta$ -амида d(ppTpTpT) 20%,  $D_{240}/D_{270} = 0,55$  (по данным МКХ, рис. 4, а).

$\gamma$ -*N*-(*n*-Аминобензил)-*N*-метиламид *d(pppTpTpTpCpC)* (II). 2,5 мл раствора триэтиламмониевой соли d(pppTpTpTpCpC) (10 ОЕ<sub>270</sub>/мл) в метаноле упаривали досуха. Остаток растворяли в 0,1 мл абсолютного DMSO, добавляли 20 мкл раствора DCC в абсолютном DMSO (1 ммоль/мл) и 20 мкл раствора хлористого пиридиния в абсолютном DMSO (0,5 ммоль/мл). Реакцию проводили при 25°. В ходе реакции наблюдается выпадение осадка дициклогексилмочевины. Через 1 ч 10 мкл реакционной смеси смешивали с 10 мкл 2 М водного раствора этилендиамина, подкисленного HCl до рН 6. Через 5 мин раствор разбавляли до 1 мл водой и 0,1 мл наносили на микроколонку. Содержание  $\gamma$ -амида (II) в аликвоте 90%. К остатальной реакционной смеси добавляли 50 мкмоль *N*-(*n*-аминобензил)-*N*-метиламина в 0,1 мл метанола и выдерживали смесь 1 ч при 25°. Затем добавляли 2 мл воды и после экстракции эфиром (2 × 2 мл) прозрачный водный слой разбавляли до 10 мл и наносили на колонку (7,5 × 0,5 см) с DEAE-целлюлозой в Cl<sup>-</sup>-форме. Элюцию проводили в градиенте концентраций NaCl (0 → 0,24 М) в 7 М мочевины, 0,01 М трис-НСl, рН 8. Объем градиента 80 мл, скорость элюции 20 мл/ч. Одновременно анализировали аликвоту с помощью МКХ. Препаративный профиль элюции аналогичен аналитическому (рис. 5, а). Выход  $\gamma$ -амида (II) 17 ОЕ<sub>270</sub> (примерно 65%),  $D_{240}/D_{270} = 0,78$ ;  $\beta$ -амида — 4,5 ОЕ<sub>270</sub> (примерно 16%),  $D_{240}/D_{270} = 0,77$ .

$\gamma$ -(*n*-Метиламинометил)анилид *d(pppTpTpTpCpC)* (IV). В 1 мл воды растворяли при перемешивании 0,15 ммоль *n*-толуолсульфоната *N*-циклогексил-*N'*-(2-метилморфолиний)этилкарбодимида и подтитровывали раствор до рН 6 0,2 М HCl. К раствору добавляли 9 ОЕ<sub>270</sub> d(pppTp × TpTpCpC) в 0,3 мл воды и в течение 30 мин поддерживали рН раствора

в пределах 5,7—6,1 добавлением 0,2 М НСl из микропипетки. Затем к реакционной смеси приливали 1 мл 2 М раствора N-(*n*-аминобензил)-N-метиламина, доведенного НСl до рН 6. Через 10 мин реакционную смесь разбавляли до 100 мл водой и со скоростью 30 мл/ч наносили на колонку (7,5 × 0,5 см) с ДЕАЕ-целлюлозой в Cl<sup>-</sup> форме, смолу промывали 20 мл воды. Элюцию проводили как описано выше. Одновременно аликвоту анализировали с помощью МКХ. Профили элюции препаративной и аналитической хроматографии сходны (рис. 6, а). Выход  $\gamma$ -амида (IV) 4 ОЕ<sub>270</sub> (~ 40%),  $D_{240}/D_{270} = 0,92$ .

*Кислотный гидролиз  $\gamma$ -амидов (I), (II), (III), (IV).* К 0,4 ОЕ<sub>270</sub>  $\gamma$ -амида, выделенного МКХ (~ 100 мкл), добавляли 50 мкл 0,2 М НСl и выдерживали смесь 2 ч при 40°. Затем разбавленный до 0,5 мл раствор анализировали с помощью МКХ. Гидролиз проходит количественно. Результаты представлены на рис. 3, б, 4, б, 5, б.

Авторы выражают глубокую признательность Д. Г. Кнорре за постоянное внимание и интерес к работе, а также благодарят С. В. Нетесова за помощь в эксперименте.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Glonek T., Kleps R. A., Myers T. C. (1974) *Science*, 185, 352—355.
2. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Лебедев А. В., Самуков В. В., Шишкин Г. В. (1975) *Биоорган. химия*, 1, 793—799.
3. Бабкина Г. Т., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1975) *Биоорган. химия*, 1, № 5, 611—615.
4. Гриднева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1968) *Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н.*, № 12, вып. 5, 118—124.
5. Chamberlin M. J., Ring J. (1972) *J. Mol. Biol.*, 70, 224—237.
6. Hoard D. E., Ott D. G. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, 87, 1785—1788.
7. Moon M. W., Khorana H. G. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.*, 88, 1805—1809.
8. Соколова Н. И., Носова В. В., Шабарова З. А. (1972) *Докл. АН СССР*, 206, 129—131.
9. Moffatt J. G. (1974) *Can. J. Chem.*, 42, 599—604.
10. Тенер Г. (1970) В кн. *Методы исследования нуклеиновых кислот*, с. 85, «Мир», М.
11. Грачев М. А., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Нетесов С. В. (1976) *Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н.*
12. Narang S. A., Jacob T. M., Khorana H. G. (1967) *J. Amer. Chem. Soc.*, 89, 2453—2461.
13. *Синтезы органических препаратов*, под ред. Казанского Б. А. (1952) 3, с. 462, Изд-во иностр. лит., М.

Поступила в редакцию  
29.VII.1975

#### SYNTHESIS OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDE 5'-TRIPHOSPHATES AND THEIR CONVERSION INTO $\gamma$ -PHOSPHORAMIDATES

MISHENINA G. F., SAMUKOV V. V., SHUBINA T. N.

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

A method is proposed for the synthesis of oligodeoxynucleotide 5'-triphosphates. The method involves activation of the 5'-terminal phosphomonoester group by its conversion into a mixed anhydride with mesitylene-carboxylic acid, the reaction of the mixed anhydride with morpholine followed by the treatment of the 5'-phosphoromorpholidate formed with inorganic pyrophosphate.

The activation of oligodeoxynucleotide 5'-triphosphates in DMSO was studied in the presence of dicyclohexylcarbodiimide and aniline (or pyridine) hydrochloride. In the case of dpppTpTpT the formation of an activated derivative, the trinucleotide 5'-trimetaphosphate, was registered by NMR-<sup>31</sup>P spectroscopy. When reacting with N-(*p*-аминобензил)-N-метиламина в DMSO-метанол mixture, activated oligonucleotide 5'-triphosphate derivatives gave corresponding N-(*p*-аминобензил)-N-метил  $\gamma$ -фосфорамидаты in a good yield. The activation of dpppTpTpTpCpC by N-циклогексил-N'-(2-метилморфолиний)-этил карбодиимид p-толуенесульфатом в воде при рН 6 followed by the treatment with a neutral aqueous solution of N-(*p*-аминобензил)-N-метиламина yielded p-(метиламинометил)- $\gamma$ -фосфоранилидаты. Oligonucleotide 5'-triphosphate  $\gamma$ -амидаты obtained were characterized by UV absorption spectra as well as by acidic hydrolysis and ion-exchange micro-column chromatography on DEAE-cellulose.