



УДК 577.152.314'135:547.963.32.057

© 1994 Т. С. Орецкая, Х. К. Х. Ибрагим, Е. М. Волков,
Е. А. Романова, В. Н. Ташлицкий, З. А. Шабарова

ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ
1-(β -D-3'-ДЕЗОКСИ-ТРЕО-ПЕНТОФУРАНОЗИЛ)ПИРИМИДИНОВЫЕ
ЗВЕНЬЯ

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

Ключевые слова: 1-(β -D-3'-дезоксиг-трео-пентофуранозил)пиримидины, олигонуклеотиды модифицированные, фосфодиэстераза змеиного яда.

Разработаны эффективные методы множественных включений в олигодезоксирибонуклеотиды нуклеозидов с обращенной конфигурацией гидроксильной группы у C2'-атома углеводного фрагмента. Показано, что наличие 1-(β -D-3'-дезоксиг-трео-пентофуранозил)пиримидинов на 3'-конце олигонуклеотидов повышает их устойчивость к действию фосфодиэстеразы змеиного яда.

Полученные ранее данные, свидетельствующие о замедлении действия PDE на олигонуклеотиды при наличии в них концевых 1-(β -D-2'-дезоксиг-трео-пентофуранозил)тиминов (xT) [1], позволили нам предположить, что введение других подобных модифицированных звеньев — 1-(β -D-3'-дезоксиг-трео-пентофуранозил)пиримидинов (инверсия при C2'-атоме и отсутствие ее при C3'-атоме) в олигонуклеотиды даст аналогичные результаты.

Синтез 1-(β -D-3'-дезоксиг-трео-пентофуранозил)пиримидинов (tU и tC) описан японскими учеными [2], но задача получения соответствующих им синтонов для олигонуклеотидного синтеза и включения их в олигонуклеотидную цепь в этих работах не ставилась.

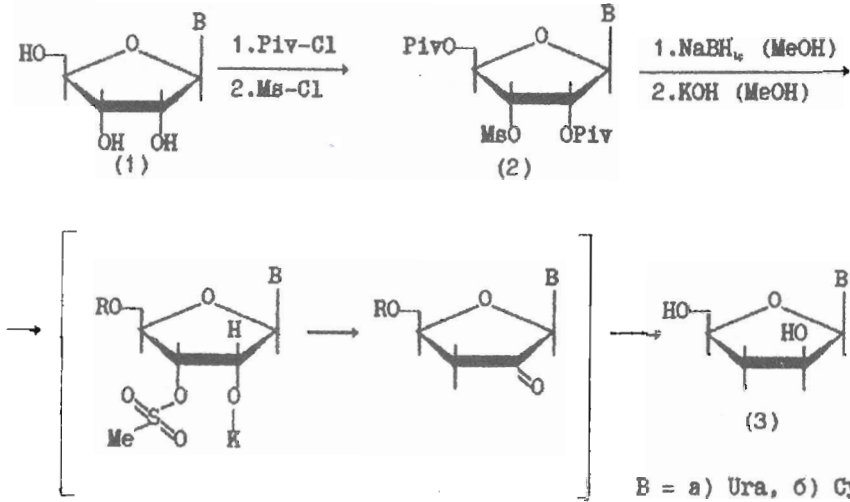
Нуклеозиды с инвертированной гидроксильной группой у C2'-атома были получены согласно схеме 1.

Бензоилирование экзоциклической аминогруппы гетероциклического основания соединения (3б), а также тритилирование 5'-О-гидроксильных групп производных

Префикс «d» (дезоксиг) при обозначении 2'-дезоксирибонуклеозидов и олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

Используемые сокращения: tU — 1-(β -D-3'-дезоксиг-трео-пентофуранозил)урацил, tC — 1-(β -D-3'-дезоксиг-трео-пентофуранозил)цитозин, xT — 1-(β -D-2'-дезоксиг-трео-пентофуранозил)тимин, Piv — пивалоил, PDE — фосфодиэстераза змеиного яда.

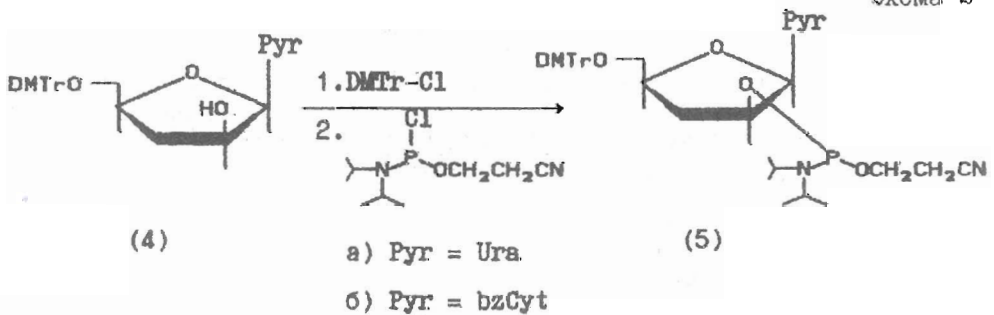
Адрес для переписки: 119899, ГСП-3, Москва, В-234, Ленинские горы, МГУ, химический факультет.



3'-дезоксипентофуранозилпиримидинов проходит по стандартным методам [3] без осложнений.

Фосфитирование 5'-O,N-защищенных модифицированных нуклеозидов (4а, б) проводили β-цианэтил-N,N-диизопропиламидохлорфосфитом в присутствии диизопропилэтиламина [4] (схема 2).

Схема 2



Время фосфитирования защищенных модифицированных нуклеозидов возросло до 5 ч, что обусловлено, по-видимому, пространственной затрудненностью гидроксильной группы нуклеозида для электрофильной атаки фосфитирующим агентом.

Олигонуклеотиды с направленными модификациями в заданных положениях олигомерной цепи представляется возможным использовать при решении широкого круга вопросов, среди которых выделим проведение химического тестирования механизма НК-белковых взаимодействий, в том числе изучение устойчивости олигонуклеотидных зондов к действию гидролизующих ферментов. Выбор структуры представленных в настоящей работе модифицированных олигонуклеотидов (I) — (VII) определялся этими задачами.

- | | |
|---------------------------|--------|
| UACACTTCTGAGtUT | (I) |
| UACCACCGCGcUA | (II) |
| UCGTTCCCTCCTGCGGGAAtURU | (III) |
| UCGTTCCCTCCTGCGGGAAtURtUT | (IV) |
| UUtUUtUUtUUtUUtUUtUUt | (V) |
| CACtUUCtUGrA | (VI) |
| CACtUUCtUGAGrU | (VII) |
| CGTTCCTCCTGCGGGAAAG | (VIII) |

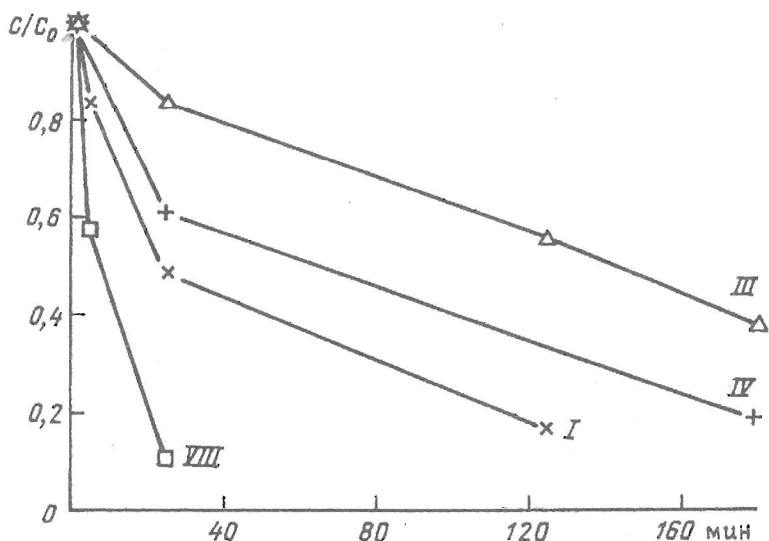


Рис. 1. Кинетические кривые гидролиза модифицированных (I, III, IV) и немодифицированного (VIII) олигонуклеотидов PDE (условия гидролиза см. «Экспер. часть»)

Олигонуклеотиды (I), (II), (VI), (VII) комплементарны участкам 49—56 и 95—105 5S рРНК *E. coli*, олигонуклеотид (V) использовался для изучения механизма действия РНКазы Н*, олигонуклеотиды (III) и (IV) содержат последовательности, комплементарные РНК вируса герпеса.

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих tU и tC, проводили по стандартной методике с увеличением времени присоединения модифицированного звена до 15 мин. Степень присоединения модифицированного звена, как правило, ниже на 3—4% по сравнению с немодифицированным. Это может быть связано как с пространственным строением соединения, так и с тем, что амидофосфиты модифицированных нуклеозидов использовались в олигонуклеотидном синтезе без дополнительной очистки.

Олигонуклеотиды выделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, используя гидрофобные свойства 5'-О-диметокситритильной группы, и затем детритилировали.

Таким образом, при использовании полученных амидофосфитных компонентов предложенные модификации могут быть включены в любое заданное положение олигонуклеотидной цепи и в любом количестве.

В жестких условиях (50° С, 5 ч) можно осуществить ферментативный гидролиз (PDE + щелочная фосфатаза) олигонуклеотидов с такими модификациями до нуклеозидов. ВЭЖХ-анализ гидролизата и сравнение с контрольной смесью подтверждает нуклеозидный состав модифицированных олигонуклеотидов.

Олигонуклеотиды, содержащие tU и tC, обладают рядом интересных свойств: при попытке анализа нуклеотидной последовательности по методу Максама — Гилберта [5] оказалось, что олигонуклеотиды (I) и (III) не являются субстратами Т4-полинуклеотидкиназы и их 5'-конец профосфорилировать невозможно, тогда как олигонуклеотиды (II) и (IV) фосфорилируются нормально. Модификация внутри нуклеотидной цепи при секвенировании «не прочитывается», радиоактивность отсутствует во всех 4 колонках геля.

Кинетические закономерности гидролиза олигонуклеотидов под действием PDE изучались на примере соединений (I), (III) и (IV), различающихся нуклеотидной последовательностью и количеством модифицированных звеньев на 3'-конце олигомеров. В качестве контроля использовали немодифицированный 19-звенный олигонуклеотид (VIII).

* Данные будут опубликованы отдельно.

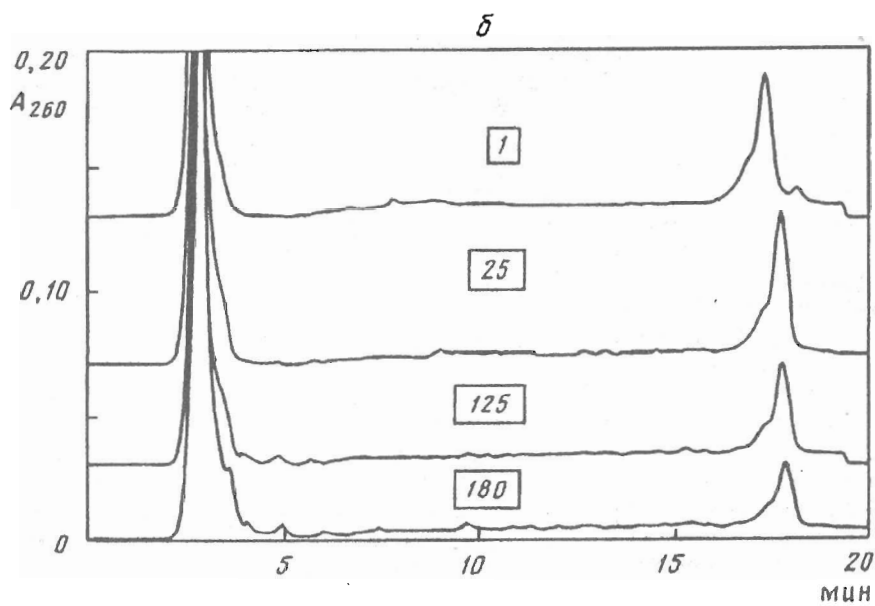
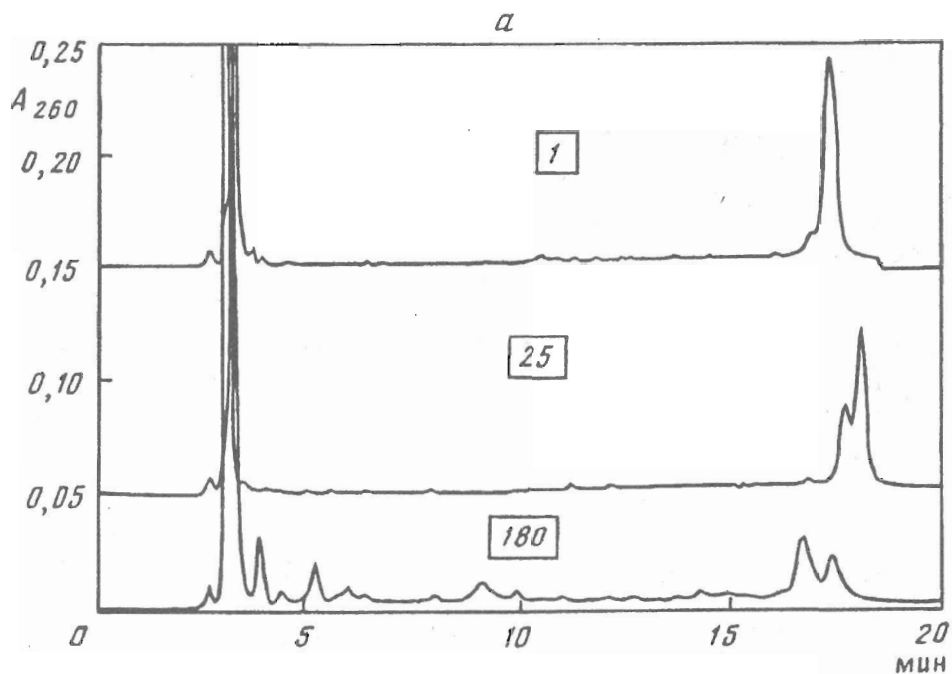


Рис. 2

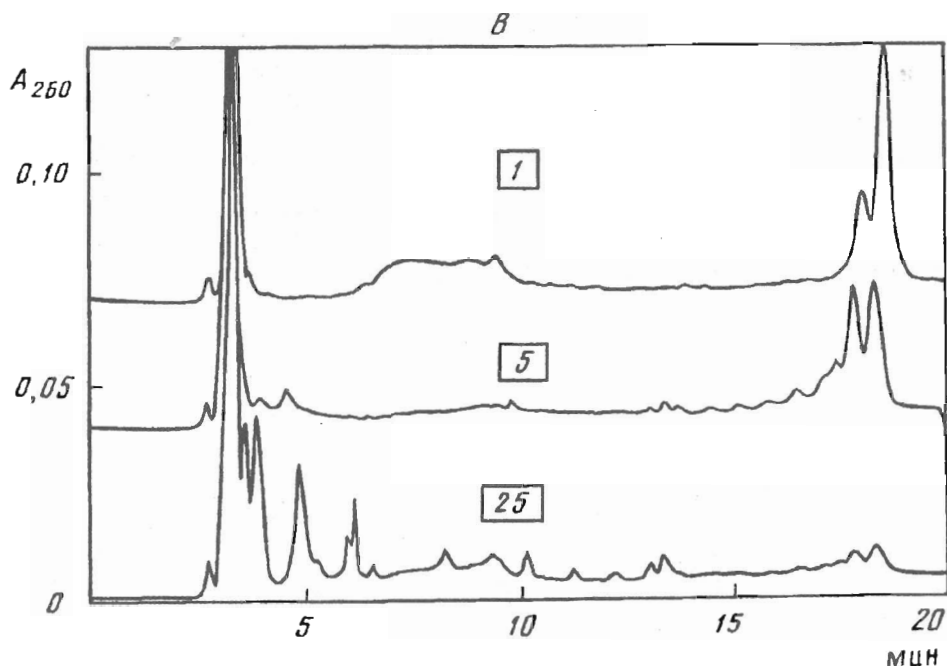


Рис. 2. Контроль методом ион-парной ВЭЖХ процесса гидролиза PDE модифицированных олигонуклеотидов (IV) (а), (III) (б) и олигонуклеотида (VIII) (в). Условия хроматографии и гидролиза см. «Экспер. часть». Цифры в рамках — время гидролиза (мин)

Анализ реакционных смесей олигонуклеотидов с PDE проводился с помощью ион-парной ВЭЖХ.

Количественные характеристики гидролиза определяли по соотношению площадей пиков гидролизующего соединения и внутреннего стандарта, в качестве которого использовали уридин:

$$C/C_0 = (A_0/A_u^0)/(A_u A_{0t}^0),$$

где C/C_0 — относительная концентрация олигонуклеотидов в процессе гидролиза; A_{0t}^0 и A_{0t} — площади пиков олигонуклеотидов в начальный и текущий момент времени; A_u^0 и A_u — соответствующие площади пиков уридина.

Временная зависимость относительной концентрации исходных олигонуклеотидов, как модифицированных, так и природного, в ходе гидролиза под действием PDE имеет экспоненциальный характер (рис. 1). По начальному участку кривых на графике, построенном в полулогарифмических координатах, рассчитана начальная скорость гидролиза. Оказалось, что начальная скорость гидролиза модифицированных субстратов (I), (IV) и (III) меньше, чем для немодифицированного олигонуклеотида (VIII), соответственно в 3, 4 и 18 раз. Время полупревращения ($\tau_{1/2}$) в выбранных одинаковых условиях (температура, концентрация субстратов и фермента) составило соответственно 24, 32 и 137 мин (для немодифицированного олигонуклеотида — 7,7 мин). Анализ данных ион-парной хроматографии в ходе ферментативного гидролиза показывает, что для субстрата (IV) (рис. 2а) убыль концентрации исходного олигонуклеотида сопровождается накоплением олигонуклеотидов, укороченных только на одно звено (аналогично для олигонуклеотида (I)). При гидролизе немодифицированного олигонуклеотида (VIII) (рис. 2в) образуется большое число продуктов гидролиза, а при гидролизе субстрата (III), содержащего на 3'-конце два модифицированных звена, существенного накопления частично гидролизованных продуктов не наблюдается (рис.

2б). Учитывая строение олигонуклеотидов (I) и (IV), содержащих на 3'-конце немодифицированное звено, их гидролиз под действием PDE можно контролировать по убыли концентрации как исходного, так и укороченного на одно звено олигонуклеотидов. В последнем случае время полупревращения олигонуклеотидов (I) и (IV) составляет 52 и 89 мин, а начальная скорость их гидролиза меньше скорости гидролиза немодифицированного олигонуклеотида в 7 и 12 раз соответственно.

Повышенная гидролитическая устойчивость полученных модифицированных олигонуклеотидов при незначительном уменьшении термической стабильности ДНК-дуплексов, один из тяжёлых которых содержит концевые модификации, позволяет сделать вывод о возможности их применения в антисенсовой биотехнологии.

Экспериментальная часть

В работе использовали 5'-О-диметокситритил-3'-(N,N-диизопропиламидо)-β-цианэтилфосфиты 2'-дезоксирибонуклеозидов (Applied Biosystems, США), уридин и цитидин (Fluka, Швейцария), β-цианэтил-N,N-диизопропиламидохлорфосфит (Aldrich, США), щелочную фосфатазу (926 ед. акт./мг) и фосфодиэстеразу змеиного яда (2,38 ед. акт./мг; Serva, Германия).

Олигонуклеотидный синтез природных и модифицированных олигонуклеотидов выполняли на автоматическом ген-синтезаторе Applied Biosystems 380B (США). В качестве полимерного носителя использовали Small Scale dN CPG (Applied Biosystems, США) с загрузкой первым нуклеозидным звеном 20—24 мкмоль/г.

Кривые температурной зависимости УФ-поглощения регистрировали на спектрофотометре Hitachi 150-20 (Япония), снабженном термостатированным кюветодержателем и блоком для измерения температуры, при непрерывном повышении температуры со скоростью 1°С/мин (длина оптического пути 1 см).

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) с использованием следующих систем растворителей (соотношение по объёму): хлороформ — этанол, 9 : 1 (А), хлороформ — триэтиламин, 98 : 2 (Б).

Синтез 1-(β-D-3'-дезокситреопентофуранозил)урацила (3а) и 1-(β-D-3'-дезокситреопентофуранозил)цитозина (3б) осуществляли по методикам [2].

1-(β-D-5'-О-Диметокситритил-3'-дезокситреопентофуранозил)урацил (4а) получали по стандартной методике [3]. Выход 62%; R_f 0,51 в системе (А). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м. д.): 7,68 (дд, 1H, H-6, J_{5,6} 8,1 Гц), 6,7—7,5 (м, Аг), 5,93 (д, 1H, H-1', J_{1',2'} 4,15 Гц), 5,37 (дд, 1H, H-5'), 4,62 (м, 1H, H-2'), 4,3 (ушир. с, 1H, OH-2'), 4,2 (м, 1H, H-4'), 3,76 (д, 6H, CH₃), 3,36—3,43 (м, 2H, H-5'), 2,32 (м, 1H, H-3'), 2,00 (м, 1H, H-3').

1-(β-D-5'-О-Диметокситритил-3'-дезокситреопентофуранозил)-4-N-бензоилцитозин (4б) получали из соединения (3б) с использованием стандартных методик бензоилирования хлористым бензоилом и тритилирования [3]. Выход 75%; R_f 0,63 в системе (А). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м. д.): 7,9 (д, 1H, H-6, J_{5,6} 9,0 Гц), 6,85-7,75 (м, Аг), 6,07 (д, 1H, H-1', J_{1,2} 4,62 Гц), 4,75 (м, 1H, H-2'), 4,3 (м, 1H, H-4'), 3,33 (дд, 1H, H-5'а, J_{5'а,5'б} 10,1 Гц, J_{4',5'а} 3,72 Гц), 3,60 (дд, 1H, H-5'б, J_{4',5'б} 2,5 Гц), 2,05—2,32 (м, 1H, H-3').

Получение 3'-(N,N-диизопропиламидо)-β-цианэтилфосфитов 5'-О,N-защищенных модифицированных нуклеозидов (5а, б). 0,5 ммоль 5'-О,N-защищенного нуклеозида и 390 мл (2,3 ммоль) диизопропилэтиламина растворяли в 1,5 мл абс. хлористого метилена, добавляли 237 мл (1 ммоль) β-цианэтил-N,N-диизопропиламидохлорфосфита при комнатной температуре. Полноту прохождения реакции контролировали ТСХ в системе (Б). По окончании реакции реакцию

смесь разбавляли хлористым метилом (20 мл), промывали дважды насыщенным раствором хлористого натрия. Объединенные органические вытяжки сушили над сульфатом натрия, осушитель отфильтровывали, растворитель упаривали, остаток сушили в вакууме до образования пены, которую заливали абс. пентаном и выдерживали 16—18 ч при 5° С. Растворитель декантировали, полученный амидофосфит сушили в вакууме, хранили под аргоном при —20° С. Для соединений (5а) и (5б) R, соответственно 0,5 и 0,63 в системе (Б).

Защитные группы после синтеза олигонуклеотидов удаляли как описано нами ранее [6].

Анализ реакционных смесей и выделение олигонуклеотидов проводили, как описано нами ранее [1].

Определение нуклеозидного состава. 0,2 ОЕ₂₆₀ олигонуклетида растворяли в 6 мкл 0,2 М трис-НСI-буфера, содержащего 0,04 М MgCl₂ (рН 8,5), добавляли 2 мкл щелочной фосфатазы (0,26·10⁻³ ед. акт./мкл) и 2 мкл фосфодиэстеразы змеиного яда (0,48·10⁻² ед. акт./мкл). Реакционную смесь инкубировали 5 ч при 50° С. Продукт гидролиза анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ по методу [1].

Гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда. К смеси 0,25 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотидов (I)—(IV) или (VIII) и 1 ОЕ₂₆₀ уридина в 17 мкл буфера (см. предыдущую методику) добавляли 3 мкл раствора PDE (0,48·10⁻² ед. акт./мкл). Смесь инкубировали при 37° С, отбирая через 1, 5, 25, 125 и 180 мин аликвоты реакционной смеси и анализируя состав методом ион-парной ВЭЖХ.

Анализ реакционной смеси в процессе гидролиза олигонуклеотидов PDE проводили методом ион-парной ВЭЖХ на приборе Waters (США). Условия аналитического разделения: колонка 4×250 мм, сорбент — Диасорб С-16_г (размер частиц 7 мкм), температура колонки 45° С, элюент — 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,0), содержащий 2 мМ тетрабутиламмоний-ион, с градиентом ацетонитрила (5—40%), расход элюента 1 мл/мин. Градиент концентрации ацетонитрила, удовлетворяющий эквидистантной элюции олигонуклеотидов с шагом 2 звена в 1 мин, рассчитывается с помощью специальной программы по результатам разделения тестовой смеси олигонуклеотидов.

Авторы выражают благодарность В. Н. Сергееву (химический факультет МГУ) за проведение анализа модифицированных олигонуклеотидов по методу Максама — Гилберта.

Работа выполнена при поддержке программы «Университеты России».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крынецкая Н. Ф., Чеботарь О. А., Ибрагим Х. К. Х., Романова Е. А., Ташлицкий В. Н., Орецкая Т. С., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // *Биоорганическая химия*. 1994. Т. 20. № 6. С. 669—675.
2. Kawana M., Nishikawa M., Yamasaki N., Kuzuhara H. // *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I*. 1989. P. 1593—1596.
3. Jones R. A. // *Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach*. /Ed. M. J. Gait. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1984. P. 23—34.
4. Barone A. D., Tang I. J., Caruthers M. H. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 10. P. 4051—4061.
5. Maxam A. M., Gilbert W. // *Meth. Enzymol.* 1980. V. 65. P. 499—560.
6. Шмидт С., Кузнецова Л. Г., Романова Е. А., Ниманн А., Орецкая Т. С., Крынецкая Н. Ф., Метелев В. Г., Шабарова З. А. // *Биоорганическая химия*. 1991. Т. 17. № 6. С. 823—830.

Поступила в редакцию
4. II. 1994
После доработки
23. III. 1994

*T. S. Oretskaya, H. K. H. Ibragim, E. M. Volkov, E. A. Romanova,
V. N. Tashlitsky, Z. A. Shabarova*

**SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING
1-(β -D-3'-DEOXY-THREO-PENTOFURANOSYL)PYRIMIDINES
AND THEIR RESISTANCE TO THE ACTION OF SNAKE
VENOM PHOSPHODIESTERASE**

*Chemical Department, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow,
119899*

Key words: 1-(β -D-3'-deoxy-threo-pentofuranosyl)pyrimidines, modified oligonucleotides, snake venom phosphodiesterase.

Effective methods of multiple incorporations of nucleotides with the inverted configuration of C2' hydroxyl group have been developed. The presence of tU and tC as 3'-terminal oligonucleotide modifications is shown to increase their resistance to snake venom phosphodiesterase. The obtained compounds are promising for the use in antisense biotechnology.