



УДК 577.113.6/577.113.7

НОВЫЙ ПОДХОД К ПРОБЛЕМЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА КАРБОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ НЕЙЛОНОВЫХ МЕМБРАНАХ ДЛЯ ГИБРИДИЗАЦИИ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

© 1995 г. М. Г. Ивановская*, И. А. Козлов, Н. А. Нарышкин, З. А. Шабарова

*Химический факультет и Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова*

Поступила в редакцию 13.07.94 г. После доработки 15.09.94 г.

Предложен простой и эффективный метод ковалентной иммобилизации олигонуклеотидов на карбоксилсодержащих нейлоновых мембранах. Метод основан на реакции, протекающей между аминоалкильной группой олигонуклеотида, введенной в него постсинтетически, и карбоксилем мембраны под действием водорастворимого 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC). На основании данных по механизму активации карбоксильной группы под действием EDC подобраны оптимальные условия иммобилизации, позволяющие достигнуть эффективности иммобилизации и емкости носителя, превышающих описанные ранее. На примере 23-звенного олигонуклеотида, иммобилизованного на мембране, показана способность иммобилизованных олигонуклеотидов эффективно гибридизоваться с комплементарными последовательностями.

Ключевые слова: иммобилизация олигонуклеотидов, "обратная" гибридизация, олигонуклеотидные зонды, активация карбоксильной группы.

Стремительный прогресс в молекулярной биологии обусловлен в значительной мере разработкой методов детекции специфических ДНК- и РНК-последовательностей. Метод молекулярной гибридизации является в настоящее время наиболее быстрым и точным инструментом для выявления участков определенной первичной структуры. Использование синтетических олигонуклеотидов в качестве гибридизационных зондов позволило расширить сферу использования этого метода для решения различных научных и практических задач. Важное достоинство олигонуклеотидных зондов – их доступность и возможность выявления точечных замен в структуре нуклеиновых кислот, что недостижимо при работе с полинуклеотидными зондами.

В традиционном варианте гибридизационного анализа исследуемая нуклеиновая кислота иммобилизуется на нитроцеллюлозных фильтрах или нейлоновых мембранах и гибридизуется с олиго-

нуклеотидным зондом, находящимся в растворе. В то же время существует целый ряд задач, когда необходимо в одном и том же образце НК выявить множество нуклеотидных последовательностей, например найти в геномной ДНК ряд мутаций, ответственных за возникновение того или иного наследственного заболевания. В этом случае становится необходимым проведение целой серии гибридизаций отдельно с каждым из зондов, специфичных для данной мутации. Более удобно и экономично в подобной ситуации использование варианта "обратной" гибридизации, который заключается в том, что иммобилизованный на мембране олигонуклеотидный зонд гибридизуется с исследуемым образцом НК, находящимся в растворе [1]. Если на одной мембране иммобилизовать полный набор олигонуклеотидных зондов, специфичных для всех исследуемых участков, то в результате одной гибридизации с меченым образцом НК становится возможным выявить все участки НК, комплементарные иммобилизованным олигонуклеотидам. Этот подход, ранее использованный в ряде работ [1, 2], пока не получил широкого практического применения. Одна из причин этого – отсутствие простых и эффективных методов ковалентной иммобилизации олигонуклеотидов на мембранах.

Единственный метод, удовлетворяющий требованиям "обратной" гибридизации, описан в

Использованы сокращения: НК – нуклеиновая кислота, PVP – поливинилпирролидон, BSA – бычий сывороточный альбумин, MES – морфолинэтаносульфокислота, EDC – 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимид. Префикс "d" (дезоксид) опущен, поскольку использовались только дезоксирибоолигонуклеотиды.

* Адрес для переписки: 119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, лаборатория химии нуклеиновых кислот, Ивановской М.Г.

работе Занга и сотр. [2] и заключается в ковалентном присоединении производного олигонуклеотида, содержащего алифатическую аминогруппу, к нейлоновой мембране, несущей на поверхности карбоксильные группы, предварительно активированные EDC. Тем не менее этот метод имеет ряд недостатков, в частности сложность синтеза аминокислотного производного олигонуклеотида и плохую воспроизводимость, вызванную, по-видимому, тем, что стадия преактивации носителя неконтролируема [3].

В настоящем сообщении мы предлагаем более простую и быструю методику иммобилизации олигонуклеотидов на карбоксилсодержащих нейлоновых мембранах, позволяющую получать мембраны более высокой емкости.

Среди множества твердофазных носителей, используемых для иммобилизации олигонуклеотидов, следует отметить преимущества носителей, имеющих на поверхности отрицательно заряженные группировки. Наличие отрицательного заряда на поверхности носителя позволяет свести к минимуму эффект неспецифического связывания олигонуклеотида с носителем. В связи с этим проблема иммобилизации олигонуклеотидов на карбоксилсодержащих носителях, и в частности на нейлоновых мембранах, заслуживает специального рассмотрения. В настоящей работе, так же как в упоминавшемся ранее сообщении Занга [2], в основе ковалентной иммобилизации олигонуклеотида на мембране лежит реакция между аминогруппой, введенной в состав олигонуклеотида, и карбоксильной группой мембраны. Для отработки условий максимально эффективного ковалентного связывания олигонуклеотида с мембраной необходимо учитывать механизм активации карбоксильных групп под действием EDC и реакцию образующихся производных с аминокислотными соединениями.

Занимаясь вопросом активации карбоксильной группы олигонуклеотидов водорастворимым карбодимидом, мы пришли к заключению, что реакция карбоксила с амином в присутствии EDC может протекать либо через образование *O*-ацилмочевинного производного и быстрого замещения его под действием присутствующего в реакционной смеси амина, либо через промежуточное образование относительно стабильного уреидного производного, синтез и свойства которого мы описали в предыдущем сообщении [4].

В упомянутой выше работе Занга [2] иммобилизация аминокислотсодержащего олигонуклеотида протекала, очевидно, через образование относительно устойчивого *N*-ацил-, а не *O*-ацилмочевинного производного, как полагают авторы [2]. *O*-Ацилмочевинное производное существует лишь как короткоживущий интермедиат при кислых значениях pH, а по приведенной авторами [2]

методике карбоксилсодержащая мембрана после обработки EDC в воде вначале отмывается водой и лишь затем обрабатывается водным буферным раствором олигонуклеотида с pH 8.4. В этих условиях *O*-ацилмочевинное производное либо гидролизует, либо превращается в *N*-ацилмочевинное производное, свойства которого мы изучили [4]. Полученные нами данные подтверждают возможность взаимодействия *N*-ацилмочевинных производных с аминами в слабощелочной среде. Полное расщепление *N*-ацилмочевинных производных достигается обработкой 0.1 М NaOH в воде [4, 5]. Именно эти условия были использованы Зангом [2] для инактивации носителя, что подтверждает механизм иммобилизации за счет образования уреидных производных.

Более активно *O*-ацилмочевинное производное. Известно, что оно очень быстро вступает в реакцию нуклеофильного замещения с аминами [6]. Поэтому мы сочли более целесообразным использовать именно эту реакцию для иммобилизации олигонуклеотидов. Для этого носитель обрабатывали EDC в присутствии аминокислотсодержащего олигонуклеотида в найденных нами оптимальных условиях: 0.25 М EDC, 0.4 М MES-буфер, pH 4.25, 2 ч, 20°C.

Аминоэтиламин олигонуклеотида (5') AGT-TGGGTAACGCCAGGGTTTTr-NH-(CH₂)₂-NH₂ (I) был получен путем постсинтетического присоединения этилендиамина к 3'-фосфорилированному олигонуклеотиду в водной среде под действием EDC, как описано в работе [7]. Для контроля за степенью иммобилизации этого олигонуклеотида по 5'-концу его была введена ³²P-метка с помощью T4-полинуклеотидкиназы по стандартной методике [8].

³²P-Меченый олигонуклеотид (I) был нанесен на мембрану и обработан 0.25 М раствором EDC в 0.4 М MES-буфере в течение 2 ч при 20°C. Затем нековалентно сорбированный олигонуклеотид отмывали 1 ч 0.5 М водным раствором NaHCO₃, содержащим 0.1% SDS, при 20°C. Абсолютное количество олигонуклеотида, иммобилизованного в пятне, рассчитанное по удельной радиоактивности, составило ~8 пмоль, в то время как в упомянутой выше работе [2] — 5 пмоль. Степень иммобилизации, рассчитанная как отношение радиоактивности мембраны после отмывки ко всей наносимой радиоактивности, составила 42%. Эта же величина в работе [2] составила 10%.

Чтобы оценить возможность использования метода иммобилизации в гибридизационном анализе, мы оценили способность иммобилизованного 23-звенного олигонуклеотида (I) образовывать комплекс с комплементарной последовательностью. Вначале олигонуклеотид (I), не содержащий радиоактивной метки, был иммобилизован на мембране в условиях, описанных выше. После

прегибридизации мембраны проводили гибридизацию с комплементарным 23-звенным ^{32}P -меченым олигонуклеотидом ^{32}P -АААСССТГГССТТАСССААСТ (II) в стандартных условиях.

Для проверки специфичности гибридизации на той же мембране был иммобилизован 23-звенный олигонуклеотид со случайной последовательностью. Методом автордиографии было показано отсутствие неспецифичной гибридизации. Использование в гибридизации ^{32}P -меченого зонда известной удельной активности в абсолютном количестве, заведомо не превышающем количества иммобилизованного олигонуклеотида, позволило нам оценить эффективность гибридизации как процент связавшегося с мембраной олигонуклеотида (II). В наших условиях эта величина составила 50%. Следует отметить, что указанный подход очень удобен для оценки эффективности гибридизации и получения сравнительных данных по степени комплексообразования.

Таким образом, проведенный нами анализ данных по реакционной способности карбоксила в присутствии EDC позволил нам подобрать оптимальные условия иммобилизации олигонуклеотидов, содержащих аминоалкильную группу, на карбоксилсодержащих нейлоновых мембранах. Методика иммобилизации проста, легко воспроизводима и может использоваться для ковалентного связывания олигонуклеотидов с другими носителями и любыми карбоксилсодержащими соединениями: белками, пептидами, антибиотиками. Сам принцип иммобилизации через концевую группу хорош тем, что олигонуклеотид максимально доступен для биоспецифических взаимодействий. Иммобилизация на одной подложке сразу ряда зондов позволяет выявлять различные последовательности в объекте одновременно.

Предлагаемый метод ковалентной иммобилизации олигонуклеотидов может служить хорошей основой для внедрения методики "обратной" гибридизации в практику диагностики инфекционных и наследственных заболеваний, генотипирования, криминалистики и селекции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы LiClO_4 , гидрокарбонат аммония (Fluka, Швейцария); MES, SDS, гидрохлорид 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимида, этилендиамин, NaCl (Merck, ФРГ); акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, гидрохлорид трис(гидроксиэтил)аминометана (Serva, ФРГ); фикола-400 (Pharmacia, Швеция); PVP (Sigma, США); T4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78; Fermentas, Литва); мембрана "Biodyne C" (Pall, США); остальные реактивы отечественного производства.

Гель-фильтрацию проводили на колонке (8 × 170 мм) с биогелем P2 (200 - 400 меш, Bio-Rad, США). Гель-электрофорез осуществляли в пластинах 20% ПААГ в 0.05 М трис-боратном буфере (pH 8.0), содержащем 1 мМ EDTA.

Составы буферных растворов. MES-буфер: 0.4 М MES, pH 4.25. TBE-буфер: 0.05 М трис(гидроксиэтил)аминометана гидрохлорида, 0.05 М H_3BO_3 , 0.001 М EDTA, pH 8.3. Гибридизационный буфер: 6 × SSC, 5 × DS, 0.1% SDS и 10 мг озвученной ДНК спермы лососевых рыб; 20 × SSC: 3 М NaCl, 0.3 М цитрат натрия, pH 7.2; 50 × DS (Denhardt's solution): 1% фикола-400, 1% PVP, 1% BSA.

Олигонуклеотиды (I) и (II) были синтезированы ранее амидофосфитным методом [9] на автоматическом синтезаторе фирмы Applied Biosystems (США).

Получение (5') AGTTGGGTAACGCCAGGG-TTTTр-NH-(CH₂)₂-NH₂ (I) вели по методике, описанной в работе [7]. К 1 - 10 нмоль олигонуклеотида (I) добавляли 10 мкл 2 М гидрохлорида этилендиамина, EDC до конечной концентрации 0.5 М и выдерживали 12 ч при 4°C. Продукт реакции отделяли от низкомолекулярных веществ гель-фильтрацией на биогеле P2. Контроль за протеканием реакции осуществляли методом гель-электрофореза в 20% ПААГ. Выход (I) составил 98%.

Иммобилизация олигонуклеотида на мембранах, содержащих карбоксильные группы. 8 - 12 пкмоль этилендиаминного производного олигонуклеотида (I) наносили из объема 1 мкл на мембрану Biodyne C размером 0.5 × 0.5 см. В место нанесения олигонуклеотида вводили 3 мкл свежеприготовленного 0.25 М раствора EDC в 0.4 М MES-буфере. Мембрану выдерживали 2 ч при 20°C и отмывали 1 ч 0.5 М раствором гидрокарбоната аммония, содержащим 0.1% SDS, при 20°C.

Гибридизация с комплементарным олигонуклеотидом. Мембраны с иммобилизованным олигонуклеотидом (I) (7 - 9 пкмоль) помещали в 1 мл гибридизационного буфера и выдерживали 1 ч при 37°C. Гибридизацию проводили в том же буфере, содержащем 2 пкмоль ^{32}P -меченого олигонуклеотида (II), в течение 12 ч при 37°C. Мембраны отмывали 6 × SSC 5 раз по 1 мин. Эффективность гибридизации оценивали как процент радиоактивности, связавшейся с мембраной, от всей взятой в гибридизацию радиоактивности. Локализация ^{32}P -меченого зонда в месте нанесения комплементарного олигонуклеотида подтверждена с помощью автордиографии мембраны после гибридизации.

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам кафедры химии природных соединений МГУ ст. научным сотрудникам Т.С. Орецкой и Е.М. Волкову за выполнение



УДК 577.113.3

СИНТЕЗ И НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОСФОНИЛЬНЫХ АЦИКЛИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ 2'-ДЕЗОКСИАДЕНОЗИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

© 1995 г. Д. В. Малахов, Д. Г. Семизаров, М. В. Ясько

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
117984, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 09.12.93 г. После доработки 26.10.94 г.

Осуществлен синтез 9-[2-(фосфонометилкарбониламино)этил]аденина, его изомера – 9-[(2-фосфоноэтил)аминокарбонилметил]аденина и 9-[2-[(2-фосфоноэтил)карбониламино]этил]аденина и их дифосфатов. Показано, что все три дифосфата включаются в 3'-конец цепи ДНК при катализе синтеза обратной транскриптазой вируса миелобластоза птиц, но не являются субстратами ДНК полимераз α из плаценты человека и β из тимуса теленка, а также концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы из тимуса теленка.

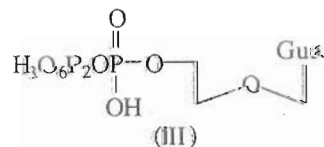
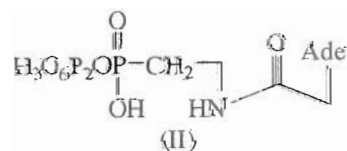
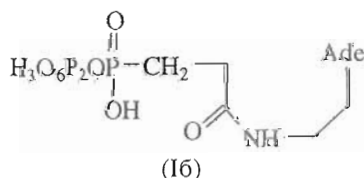
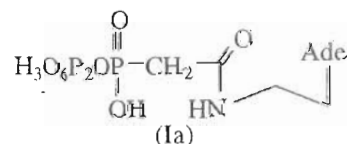
Ключевые слова: нуклеозиды; нуклеотиды, аналоги.

Среди различных фосфонильных ациклических аналогов нуклеотидов наиболее известны в качестве антиретровирусных агентов фосфонометоксильные производные, например 9-(2-фосфонометоксиэтил)аденин [1, 2]. Известны также фосфоноалкильные и фосфонометоксильные аналоги ациклогуанозина, обладающие активностью против вируса герпеса [3, 4]. В недавно опубликованной работе [5] отмечается антигерпесная и антиретровирусная активность некоторых ациклических фосфонильных аналогов, содержащих двойную связь в α -положении к атому фосфора.

Также сообщалось о способности трифосфата 9-(гидроксиэтиламинокарбонилметил)аденина проявлять свойства терминаторного субстрата ДНК-полимераз [6], однако соответствующий нуклеозидный аналог и его гомологи не обладали цитотоксичностью и антивирусной активностью в культурах клеток [7]. По-видимому, такие ациклические аналоги нуклеозидов не превращаются в клетке в соответствующие трифосфаты.

Нами были синтезированы три ациклических фосфонильных аналога, имитирующих нуклеозидмонофосфат, а также их дифосфаты. Изучена способность последних проявлять свойства тер-

минаторных субстратов по отношению к различным ДНК-полимеразам.



Структура двух синтезированных соединений (Ia) и (II) моделирует ациклогуанозинтрифосфат (III) – активную внутриклеточную форму ациклогуанозина (ацикловира), но в то же время ациклический компонент в них содержит элементы жесткости за счет амидной группы. Некоторые

Сокращения: CDI – N,N'-карбонилдиимдазол, ОТ – обратная транскриптаза, ВИЧ – вирус иммунодефицита человека, ВМП – вирус миелобластоза птиц, TdT – терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза.

нуклеозид-5'-трифосфаты, содержащие в молекуле "жесткий" фрагмент, являются терминаторными субстратами [8, 9]. Соединение (Iб) можно рассматривать как ациклический аналог ddATP. Выбор в качестве гетероциклического основания аденина был обусловлен как соображениями удобства химического синтеза, так и сообщением А. Бапафа и соавт. [10], в котором указывается, что ациклоаденозинтрифосфат может проявлять больший ингибирующий эффект, чем ациклогуанозинтрифосфат.

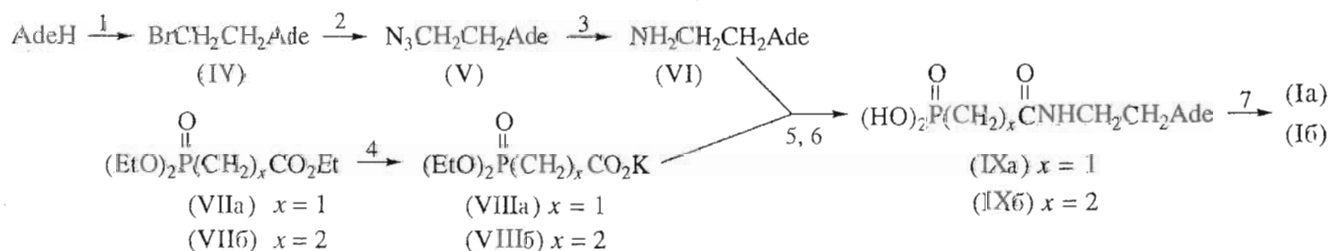
Синтез одной группы соединений приведен на схеме 1. Реакцией аденина с 1,2-дибромэтаном в присутствии гидрида натрия был получен 9-(2-бромэтил)аденин (IV), в котором бром был далее замещен на азидогруппу. Восстановление этой группы привело к 9-(2-аминоэтил)аденину (VI), который конденсировали с диэтилфосфоуксусной (VIIa) или диэтилфосфопропионовой (VIIб) кислотами при активации CDI. В результате деблокирования образовавшихся диэтиловых эфиров с использованием триметилбромсилана

были получены фосфонильные производные (IXa) и (IXб).

Синтез второй группы соединений (схема 2) был осуществлен начиная с алкилирования аденина этиловым эфиром бромуксусной кислоты в присутствии бис(триметилсилил)амида калия; использование такого основания вместо NaN позволило сократить время реакции и превзойти выход, указанный в работе [7]. Образовавшийся эфир (X) далее бензоилировали по аминогруппе аденина и в условиях контролируемого щелочного гидролиза получали карбоновую кислоту (XI), которую конденсировали с диэтил-2-аминоэтилфосфонатом (XIV) в присутствии CDI. Удаление этильных групп действием Me₃SiBr и дебензоилирование под действием водного аммиака привело к соединению (XVI).

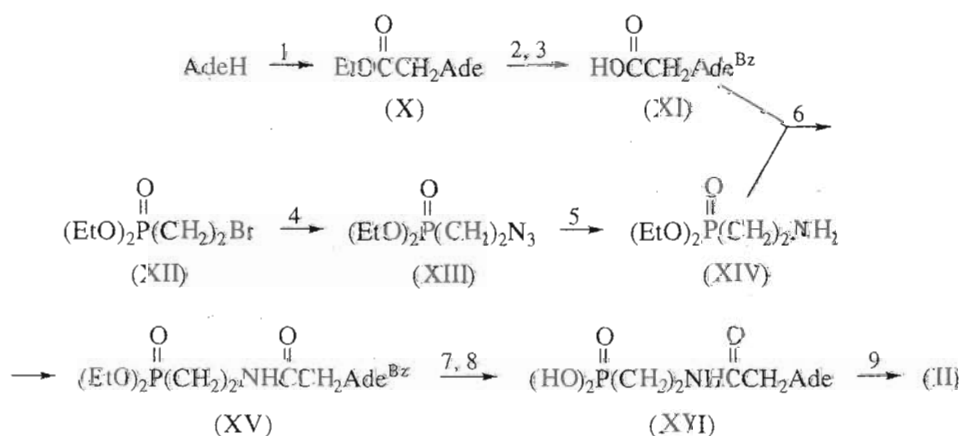
β,γ-Дифосфаты (Ia), (Iб) и (II) были получены с помощью активации CDI соответственно (IXa), (IXб) и (XVI) с последующей реакцией с пирофосфатом по методу [11].

Структура синтезированных соединений подтверждена данными ЯМР- и масс-спектрометрии;



Реагенты: 1 – NaN/DMF, BrCH₂CH₂Br; 2 – NaN₃/DMF; 3 – PPh₃, NH₃/H₂O; 4 – KOH/EtOH; 5 – CDI; 6 – Me₃SiBr; 7 – CDI, (Bu₃NH)₂H₂P₂O₇/DMF.

Схема 1.



Реагенты: 1 – (Me₃Si)₂NK/DMF, EtOCCCH₂Br; 2 – BzCl/Py; 3 – KOH/EtOH; 4 – NaN₃/DMF; 5 – H₂/Pd/C; 6 – CDI; 7 – Me₃SiBr; 8 – NH₃/H₂O; 9 – CDI, (Bu₃NH)₂H₂P₂O₇/DMF.

Схема 2.



Рис. 1. Праймер-матричный комплекс.

полимеразами α из плаценты человека и β из тимуса теленка (рис. 2, серии Б, Г, Д, дорожки 3, 4), а также TdT (данные не приведены). Соединения (Ia) и (II) проявили близкие субстратные свойства, но при этом не узнавались ДНК-полимеразой I (данные не приведены).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Диэтиловый эфир 2-бромэтилфосфоновой кислоты (VII) и триэтил-3-фосфонопропионат (VIIб) были получены по методике [12], диэтилфосфоноуксусная кислота (VIIа) – по методике [13]. Раствор бис(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфата в DMF готовили по методике [14]. Использовались DEAE-целлюлоза DE-32 фирмы Whatman (в HCO₃⁻-форме); азид натрия, 10% Pd/C, Kieselgel 60 (63 - 100 мкм) и LiChroprep RP-18 (25 - 40 мкм) фирмы Merck; триметилбромсилан, 1,2-дибромэтан, 80% суспензия NaN в минеральном масле, триэтилфосфит, триэтилфосфоноацетат, аденин, трифенилфосфин, бис(триметилсилил)амид калия и CDI фирмы Fluka; дауэкс 50 WX 8 фирмы Serva; пиридин и DMF фирмы Aldrich.

¹H-ЯМР-спектры сняты на приборе Varian XL-100-15 (США) с рабочей частотой 100 МГц (внутренний стандарт – *трет*-бутанол). ¹³C-ЯМР-спектры (62.89 МГц, с подавлением расщепления на протонах, внутренний стандарт – 1,4-диоксан)

их УФ-спектры соответствуют аденозиновым производным (данные не приводятся). Гомогенность веществ контролировалась с помощью ТСХ на силикагеле, а также на основании данных ЯМР-спектromетрии.

Были изучены субстратные свойства синтезированных соединений (Ia), (Iб) и (II) по отношению к некоторым ОТ ретровирусов, ДНК-полимераза млекопитающих, фрагменту Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli* и TdT из тимуса теленка. Исследования проводили в системе, содержащей 5'-³²P-меченый праймер-матричный комплекс (рис. 1), фермент и одно из исследуемых соединений или же, для контроля, природный субстрат dTTP.

Из рис. 2 (серии А и В, дорожки 3, 4) видно, что соединение (Iб) проявило субстратные свойства по отношению к ОТ ВМП и фрагменту Кленова ДНК-полимеразы I. В то же время оно не включалось в растущую цепь ДНК в реакциях удлинения праймера, катализируемых ОТ ВИЧ, ДНК-

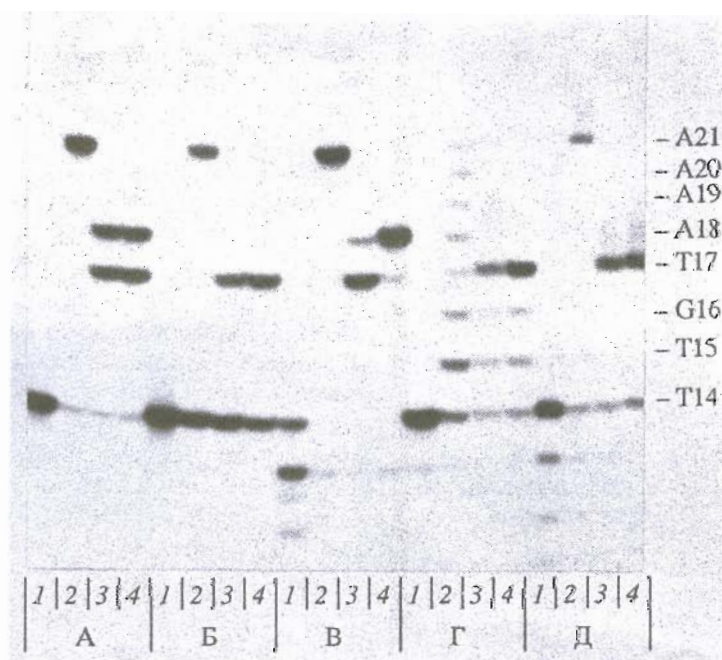


Рис. 2. Электрофорезграмма продуктов реакции элонгации 14-членного праймера ОТ ВМП (серия А), ОТ ВИЧ (Б), ДНК-полимеразой I, фрагмент Кленова (В), ДНК-полимеразой β из тимуса теленка (Г) и ДНК-полимеразой α из плаценты человека (Д). Дорожка 1 – 5'-³²P-меченый праймер-матричный комплекс (контроль); 2 – то же + 5 мкМ dTTP + 5 мкМ dGTP + 5 мкМ dATP; 3 – то же + 5 мкМ dTTP + 5 мкМ dGTP + 10 мкМ (Iб); 4 – то же + 5 мкМ dTTP + 5 мкМ dGTP + 100 мкМ (Iб).

и ^{31}P -ЯМР-спектры (101.27 МГц, без подавления расщепления на протонах, внешний стандарт – 85% фосфорная кислота) сняты на приборе Bruker WM-250 (США). Величины КССВ (J) измерены в герцах. При описании ^1H -ЯМР-спектров приняты следующие сокращения: с – синглет, д – дублет, т – триплет, к – квартет, м – мультиплет, ус – уширенный синглет, дд – дублет дублета, дт – дублет триплета, дк – дублет квартета. Масс-спектры в режиме FAB выполнены на спектрометре Kratos MS 50ТС, образцы смешивались с глицерином. Температуры плавления были определены на приборе РНМК (Германия).

9-(2-Бромэтил)аденин (IV). К интенсивно перемешиваемой суспензии 2.7 г (20 ммоль) аденина в 60 мл DMF прибавляли 0.6 г (20 ммоль) 80% NaH, а через 1 ч приливали 4 мл (46 ммоль) 1,2-дибромэтана. Перемешивали 20 ч при 20°C, нейтрализовали 0.1 М HCl, упаривали. Остаток промывали гексаном и дважды перекристаллизовывали из воды. Выход 2.68 г (55%), т. пл. >300°C (с разл.). ^1H -ЯМР (DMSO- d_6 ; δ , м. д., J , Гц): 8.15с (2H, H-2, H-8), 7.18с (2H, NH₂), 4.55т (2H, J 6, CH₂Ade), 3.96т (2H, J 6, CH₂Br). Масс-спектр, m/z : 242, 244 (1 : 1) (MH⁺).

9-(2-Азидоэтил)аденин (V). К раствору 0.6 г (2.5 ммоль) бромида (IV) в 10 мл DMF добавляли 0.3 г (4.6 ммоль) NaN₃, перемешивали 10 ч при 20°C, упаривали, остаток перекристаллизовывали из воды. Выход 0.45 г (89%), т. пл. 184.5°C. ^1H -ЯМР (DMSO- d_6): 8.15с (2H, H-2, H-8), 7.18с (2H, NH₂), 4.31т (2H, J 6, CH₂Ade), 3.84т (2H, J 6, CH₂N₃). Масс-спектр, m/z : 205 (MH⁺).

9-(2-Аминоэтил)аденин (VI). К раствору 400 мг (1.96 ммоль) азида (V) в 30 мл диоксана добавляли 790 мг (3 ммоль) трифенилфосфина, через 1 ч при 20°C обрабатывали 20 мл 25% водного аммиака. Через 2 ч упаривали, прибавляли 30 мл воды, отфильтровывали, фильтрат наносили на колонку (3 × 5 см) с дауэксом 50 (NH₄⁺), элюировали 1% водным аммиаком. Фракции, содержащие соединение (VI), упаривали. Выход 275 мг (78%). ^1H -ЯМР (пиридин- d_5): 8.21с (1H, H-8), 8.18с (1H, H-2), 6.66с (2H, 6-NH₂), 3.68т (2H, J 6, CH₂Ade), 2.59т (2H, J 6, CH₂NH), 1.15ус (2H, NH₂). Масс-спектр, m/z : 179 (MH⁺).

3-(Диэтилфосфо)пропионовая кислота, калиевая соль (VIIIб). К раствору 2.86 г (12 ммоль) соединения (VIIIб) в 2 мл EtOH при 0°C прибавляли раствор 0.74 г (13.2 ммоль) KOH в 0.8 мл воды. Через 1 ч нагревали до 20°C, через 24 ч упаривали, соупаривали с водой, остаток наносили на колонку (3 × 20 см) с LiChroprep RP-18, элюировали водой. Фракции, содержащие продукт (VIIIб), упаривали. Выход 2.47 г (83%). ^1H -ЯМР (D₂O):

4.03дт (4H, J 7 и 7, CH₂CH₃), 1.80 - 2.46м (4H, (CH₂)₂), 1.25т (6H, CH₂CH₃).

9-[2-(Фосфометилкарбониламино)этил]аденин (IXа). Раствор 295 мг (1.5 ммоль) кислоты (VIIIа) в смеси 3 мл воды, 3 мл DMF и 0.42 мл (3 ммоль) триэтиламина упаривали, соупаривали с DMF (3 × 10 мл), растворяли в 10 мл DMF, прибавляли 244 мг (1.5 ммоль) CDI, через 5 мин полученный раствор приливали к охлажденной до 0°C суспензии 130 мг (0.73 ммоль) соединения (VI) в 10 мл DMF. Реакционную массу перемешивали 30 мин при 20°C, приливали 5 мл воды, упаривали. Остаток соупаривали с DMF (3 × 10 мл), растворяли в 10 мл DMF, охлаждали до 0°C, прибавляли 1.5 мл (11.4 ммоль) триметилбромсилана, через 12 ч при 20°C упаривали, соупаривали с DMF (2 × 5 мл), остаток растворяли в 50 мл воды и наносили на колонку с DE-32 (3 × 10 см), колонку промывали водой, элюировали линейным градиентом концентрации гидрокарбоната аммония (0 → 0.15 М) в воде. УФ-поглощающие фракции упаривали, соупаривали с водой и спиртом. Выход 97 мг (44%). ^1H -ЯМР (D₂O): 8.06с и 8.01с (2H, H-8 и H-2), 4.28м (2H, CH₂Ade), 3.58м (2H, CH₂NH), 2.57д (2H, $J_{\text{CH}_2\text{P}}$ 20.5, CH₂P). ^{31}P -ЯМР (D₂O; δ , м. д.): 14.5т, $J_{\text{P,CH}_2}$ 20.5 Гц. ^{13}C -ЯМР (D₂O; δ , м. д., J , Гц): 172.5с (C=O), 155.6с (C-6), 152.6с (C-2), 149.2с (C-4), 142.9с (C-8), 118.6с (C-5), 43.8с (C-Ade), 39.4с (C-NH), 38.8д (C-P, $J_{\text{C-P}}$ 116.5). Масс-спектр, m/z : 301 (MH⁺).

9-[2-[(2-Фосфоэтил)карбониламино]этил]аденин (IXб). Раствор 373 мг (1.5 ммоль) соединения (VIIIб) в 3 мл воды наносили на колонку (1 × 8 см) с дауэксом 50 в пиридиниевой форме, элюировали водой, УФ-поглощающие фракции упаривали, соупаривали с DMF (3 × 10 мл), растворяли в 10 мл DMF, прибавляли 244 мг (1.5 ммоль) CDI, через 7 мин приливали к охлажденной до 0°C суспензии 180 мг (1 ммоль) соединения (VI) в 10 мл DMF. Реакционную массу перемешивали 30 мин при 20°C, приливали 5 мл воды, упаривали. Остаток соупаривали с DMF (3 × 10 мл), растворяли в 10 мл DMF, охлаждали до 0°C, прибавляли 2 мл (15.2 ммоль) триметилбромсилана, через 12 ч упаривали, соупаривали с DMF (3 × 5 мл), выделяли так же, как соединение (IXа). Выход 150 мг (48%). ^1H -ЯМР (D₂O): 8.06с (1H, H-8), 7.96с (1H, H-2), 4.2м (2H, CH₂Ade), 3.53м (2H, CH₂NH), 2.17м (2H, CH₂CO), 1.52м (2H, CH₂P). ^{31}P -ЯМР (D₂O): 23.6м. Масс-спектр, m/z : 315 (MH⁺).

9-[2-[(β,γ-Дифосфат)фосфометилкарбониламино]этил]аденин (Ia) и 9-[2-[[2-(β,γ-дифосфат)фосфоэтил]карбониламино]этил]аденин (Iб). Раствор 0.13 ммоль соединения (IXа) или (IXб) в 3 мл воды наносили на колонку (1 × 8 см) с

дауэксом 50 в пиридиниевой форме, элюировали водой, УФ-поглощающие фракции упаривали, прибавляли 0.1 мл трибутиламина и соупаривали с DMF (3 × 10 мл). К остатку приливали 10 мл формамида, прибавляли 150 мг (0.93 ммоль) CDI, суспензию перемешивали 24 ч при 20°C. К полученному раствору прибавляли 0.11 мл (2.8 ммоль) метанола, через 30 мин при интенсивном перемешивании добавляли по каплям 1 мл (0.5 ммоль) 0.5 М бис(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфата в DMF. Через 2 ч добавляли 70 мл воды и наносили на колонку (3 × 10 см) с DE-32, колонку промывали водой, элюировали линейным градиентом концентрации гидрокарбоната аммония (0 → 0.3 М) в воде. УФ-поглощающие фракции упаривали, соупаривали с водой и спиртом, лиофильно высушивали. Выход, %: 10 (Ia) и 7 (Iб). ¹H-ЯМР-спектр (D₂O), (Ia): 8.09с (1H, H-8), 7.98с (1H, H-2), 4.31м (2H, CH₂Ade) 3.62м (2H, CH₂NH), 2.65д (2H, J_{CH₂P} 20, CH₂P); (Iб): 8.11с (1H, H-8), 7.99с (1H, H-2), 4.25м (2H, CH₂Ade), 3.5м (2H, CH₂NH), 2.25м (2H, CH₂CO), 1.61м (2H, CH₂P). ³¹P-ЯМР (D₂O), (Ia): 6.9дт (P_α), -6.5д (P_γ), -21.3дд (P_β); J_{P_αCH₂} 20, J_{P_αP_β} 23, J_{P_βP_γ} 20. Масс-спектр, *m/z*, (Iб): 475 (MH⁺), 492 (MH⁺ + NH₃).

9-(Этоксикарбонилметил)аденин (X). К суспензии 1.35 г (10 ммоль) аденина в 30 мл DMF при перемешивании добавляли 2 г (10 ммоль) 80% бис(триметилсилил)амида калия и выдерживали 1 ч при 20°C. Затем добавляли 5 мл (45 ммоль) этилового эфира бромуксусной кислоты и реакционную смесь перемешивали 8 ч при 20°C. Упаривали, остаток промывали гексаном и перекристаллизовывали из воды. Выход 1.24 г (56%), т. пл. 221°C. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 8.18с (1H, H-8), 8.15с (1H, H-2), 7.35с (2H, NH₂), 5.10с (2H, CH₂), 4.25к (2H, J 7, CH₂CH₃), 1.21т (3H, J 7, CH₂CH₃). Масс-спектр, *m/z*: 222 (MH⁺).

6-N-Бензоил-9-(карбоксиметил)аденин (XI). Соупаривали 0.3 г (1.36 ммоль) соединения (X) с пиридином (2 × 20 мл), приливали 20 мл пиридина, полученную суспензию обрабатывали 0.16 мл (1.4 моль) бензоилхлорида. Реакционную смесь выдерживали 3 ч при 20°C и 1 ч при 50°C, упаривали, остаток обрабатывали 20 мин 5 мл 2 М КОН/EtOH-H₂O (1 : 1), нейтрализовали 1 М HCl. Выпавший осадок, представлявший собой соединение (XI), отфильтровывали. Выход 0.42 г (82%). ¹H-ЯМР (D₂O): 8.56с (1H, H-8), 8.25с (1H, H-2), 7.79м (2H, *m*-Bz), 7.48м (3H, *o*-, *p*-Bz), 4.85с (2H, CH₂Ade). Масс-спектр, *m/z*: 298 (MH⁺).

Диэтиловый эфир 2-азидоэтилфосфоновой кислоты (XII). К раствору 20 г (82 ммоль) диэтилового эфира (XII) в 100 мл DMF добавляли 10 мл абс. CH₃CN и 6 г (92 ммоль) NaN₃. Реакционную

смесь кипятили 7 ч, упаривали, соупаривали 2 раза с толуолом. Остаток фильтровали через слой силикагеля (высота 2 см) в системе CHCl₃-EtOH, 20 : 1. Выход 16 г (94%). ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 4.00дк (4H, J 8 и 7, CH₂CH₃), 3.46дк (2H, J 7 и 7, CH₂N₃), 2.05дт (2H, J 18 и 7, CH₂P), 1.25т (6H, J 7, CH₂CH₃). Масс-спектр, *m/z*: 208 (MH⁺).

Диэтиловый эфир 2-аминоэтилфосфоновой кислоты (XIV). К раствору 8 г (39 ммоль) соединения (XIII) в 100 мл EtOH добавляли 10 мг Pd/C. В реакционную смесь в течение 24 ч пропускали водород, затем смесь отфильтровывали и упаривали. Выход 5.0 г (71%). ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 3.97м (4H, CH₂CH₃), 2.0м (4H, CH₂NH₂), 1.85дт (2H, J 17 и 7, CH₂P), 1.25т (6H, J 7, CH₂CH₃). Масс-спектр, *m/z*: 182 (MH⁺).

6-N-Бензоил-9-[[2-(диэтилфосфоно)этил]аминокарбонилметил]аденин (XV). К суспензии 80 мг (0.24 ммоль) соединения (XI) в 5 мл DMF прибавляли 60 мг (0.37 ммоль) CDI. Через 1 ч прибавляли 0.2 г (0.58 ммоль) соединения (XIV), через 24 ч добавляли 1 мл воды, упаривали при 20°C и остаток наносили на колонку (2 × 10 см) с силикагелем. Продукт элюировали системой *i*PrOH-хлороформ (1 : 4). Выход 65 мг (54%). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.1м (2H, NHBz + NHC(O)), 8.07с (1H, H-2), 8.56с (1H, H-8), 7.90м (2H, *m*-Bz), 7.45м (3H, *o*-, *p*-Bz), 4.91с (2H, CH₂Ade), 4.02м (4H, CH₂CH₃), 3.50м (2H, CH₂NH), 2.0дт (2H, J 19 и 7, CH₂P), 1.25т (6H, J 7, CH₂CH₃). Масс-спектр, *m/z*: 461 (MH⁺).

9-[[2-(Фосфоноэтил)аминокарбонилметил]аденин (XVI). К раствору 40 мг (0.08 ммоль) соединения (XV) в 1 мл DMF при охлаждении до -5°C прибавляли 0.1 мл (0.76 ммоль) Me₃SiBr. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при -5°C, упаривали, остаток обрабатывали 2 мл 25% водного аммиака. Раствор выдерживали 50 ч при 20°C, упаривали, наносили на колонку (2 × 20 см) с LiChroprep RP-18, элюировали водой. Выход 21 мг (84%). ¹H-ЯМР (D₂O): 7.98с (1H, H-8), 7.91с (1H, H-2), 4.82с (2H, CH₂Ade), 3.26м (2H, CH₂NH), 1.67дт (2H, J 19 и 7, CH₂P). ³¹P-ЯМР (D₂O): 21.5м. Масс-спектр, *m/z*: 301 (MH⁺).

9-[[2-(β,γ-Дифосфат)фосфоноэтил]аминокарбонилметил]аденин (II). Растворяли 21 мг (0.07 ммоль) соединения (XVI) в 2 мл воды и переводили в пиридиниевую соль как описано для (Ia). После упаривания прибавляли 0.1 мл трибутиламина, соупаривали с DMF (3 × 10 мл), растворяли в 10 мл диметилсульфоксида и прибавляли 113 мг (0.7 ммоль) CDI, перемешивали 36 ч при 20°C. К полученному раствору прибавляли 0.1 мл (2.5 ммоль) метанола, через 30 мин при интенсивном перемешивании добавляли по каплям 1 мл

(0.5 ммоль) 0.5 М бис(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфата в DMF. Через 2 ч добавляли 70 мл воды, (II) выделяли так же, как (Ia). Выход 3 мг (9%). ¹H-ЯМР (D₂O): 7.96с (1H, H-8), 7.89с (1H, H-2), 4.8с (2H, CH₂Ade), 3.3м (2H, CH₂NH), 1.72м (2H, CH₂P). Масс-спектр, *m/z*: 461 (MH⁺), 478 (MH⁺ + NH₃).

Эксперименты в бесклеточных системах. ДНК фага M13mp10 (плюс-цепь) выделяли из культуральной жидкости *E. coli* XL-1 как описано в работе [15]. Использовали следующие ферменты: ОТ ВИЧ (любезно предоставленную Т.А. Розовской, ВКНЦ РАМН), ОТ ВМП (Омутнинский хим. завод), ДНК-полимеразу α из плаценты человека, выделенную Д.Ю. Мозжериним и соавт. [16], ДНК-полимеразу β из тимуса теленка, выделенную Г.А. Невинским и соавт. [17], фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli* фирмы Amersham (UK) и TdT из тимуса теленка (Amersham). Тетрадезоксинуклеотид (синтезированный Б.К. Черновым, ИМБ РАН) метили по 5'-положению изотопом ³²P и гибридизовали с матрицей как описано в [18]. Реакции элонгации праймера, катализируемые перечисленными ферментами, проводили в условиях [15]. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ.

Авторы выражают благодарность Н.Б. Тарусовой (ИМБ РАН, Москва) за консультативную помощь при выполнении синтеза. Работа финансировалась из гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 93-04-20542 и гранта программы "Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении. Вирусология", № 508.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Clercq E., Sakuma T., Baba M., Pauwels R., Balzarini J., Rosenberg I., Holý A. // *Antiviral Res.* 1987. V. 8. P. 261 - 272.
2. Balzarini J., Naesens L., Herdewijn P., Rosenberg I., Holý I., Pauwels R., Baba M., Johns D.G., De Clercq E. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 2. P. 332 - 336.
3. Kim C.U., Yu Luh B., Misco P.F., Bronson J.J., Hitchcock M.J.M., Ghazzouli I., Martin J.C. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. № 4. P. 1207 - 1213.
4. Kim C.U., Misco P.F., Yu Luh B., Hitchcock M.J.M., Ghazzouli I., Martin J.C. // *J. Med. Chem.* 1991. V. 34. № 7. P. 2286 - 2294.
5. Harnden R.M., Parkin A., Parratt J.M., Perkins R.M. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. № 10. P. 1343 - 1355.
6. Куханова М.К., Кузнецова Е.В., Краевский А.А., О'Хара Б., Беккер Дж., Морин Дж., Глузман Я. // *Молекулярн. биология.* 1994. Т. 28. № 3. С. 530 - 541.
7. Михайлов С.Н., Ефимцева Е.В., Фомичева М.В., Родионов М.С., Керн Е.П. // *Биоорганич. химия.* 1995. Т. 21. № 2. С. 130 - 132.
8. Krayevsky A.A., Watanabe K.A. // *Nucleosides and Nucleotides.* 1993. V. 12. № 6. P. 649 - 670.
9. Мицнер Б.И., Кочеткова М.Б., Филиппов Д.В., Цытович А.В., Дяткина Н.Б. // *Молекулярн. биология.* 1993. Т. 27. № 1. С. 174 - 184.
10. Baraf A.R., Bodner A.J., Ting R.C.Y., Cheng Y.-C. // *J. Virol.* 1989. V. 63. № 3. P. 1400 - 1403.
11. Jie L., Van Aerschot A., Balzarini J., Janssen G., Busson R., Hoogmartens J., De Clercq E., Herdewijn P. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. № 9. P. 2481 - 2487.
12. Garner A.Y., Chapin E.C., Scanlon P.M. // *J. Org. Chem.* 1959. V. 24. № 4. P. 532 - 536.
13. Cooke M.P., Biciunas K.P. // *Synthesis.* 1981. № 4. P. 283 - 285.
14. Ludwig L., Eckstein F. // *J. Org. Chem.* 1989. V. 54. № 3. P. 631 - 635.
15. Chidgeavadze Z.G., Beabealashvili R.Sh., Krayevsky A.A., Kukhanova M.K. // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. V. 868. № 2. P. 145 - 152.
16. Мозжерин Д.Ю., Атражев А.М., Куханова М.К. // *Молекулярн. биология.* 1992. Т. 26. № 5. С. 999 - 1010.
17. Колочева Т.И., Невинский Г.А. // *Молекулярн. биология.* 1993. Т. 27. № 6. С. 1368 - 1379.
18. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. // *Molecular Cloning: Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Synthesis and Biochemical Properties of Phosphonyl Acyclic Analogs of 2'-Deoxyadenosine Nucleotides

D. V. Malakhov, D. G. Semizarov, and M. V. Yas'ko

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 117984 Russia

Abstract — 9-[2-(phosphonomethyl)carbonylamino]ethyl]adenine, 9-[(2-phosphonoethyl)aminocarbonylmethyl]adenine, 9-[2-[(2-phosphonoethyl)carbonylamino]ethyl]adenine, and their diphosphates were synthesized. All three diphosphates were shown to incorporate into the 3'-terminus of the DNA chain during the synthesis of the avian myeloblastose virus catalyzed by reverse transcriptase. However, they do not serve as substrates for DNA polymerase α from human placenta, polymerase β from calf thymus, or terminal deoxynucleotidyl transferase from calf thymus.

Key words: nucleosides; nucleotides, analogs.