



УДК 547.963.32.07:577.113.4

Н-ФОСФОНАТНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОСНОВАНИЯ. I*. ФОТОАКТИВИРУЕМЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ С ПЕРФТОРАРИЛАЗИДНЫМИ ГРУППАМИ В ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ОСНОВАНИЯХ

© 1999 г. М. Н. Репкова, Т. М. Иванова, Н. И. Комарова,
М. И. Мещанинова*, М. А. Кузнецова*, А. Г. Веняминова[#]

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

*Новосибирский государственный университет

Поступила в редакцию 25.12.98 г. Принята к печати 25.03.99 г.

Предложен вариант твердофазного *N*-фосфонатного синтеза олигорибонуклеотидов, содержащих атом брома или этилендиаминовый линкер в С5- или С8-положениях уридина или аденозина. Описан синтез новых фотоактивируемых производных олигорибонуклеотидов, содержащих *n*-азидотетрафторбензоильную группу, введенную через диаминолинкер в уридин или аденозин.

Ключевые слова: уридин С5-модифицированный; аденозин С8-модифицированный; аминоклинкер; фотоактивные олигорибонуклеотиды; *N*-фосфонатный метод.

ВВЕДЕНИЕ

Фотоактивируемые производные олигонуклеотидов широко используются при изучении НК-НК- и НК-белковых взаимодействий, играющих ключевую роль в целом ряде биологических процессов [2–4]. В последние годы в качестве такого рода аналогов НК часто используют конъюгаты олигонуклеотидов и перфторарилазидов, отличающиеся простотой синтеза, высоким квантовым выходом фотодиссоциации и эффективностью в реакциях модификации биополимеров. Показано, что олигодезоксирибонуклеотиды, несущие остатки перфторарилазидов в различных положениях цепи, способны модифицировать ДНК, РНК и взаимодействующие с ними белки [5–14]. Синтезированные нами 5'-перфторарилазидные производные олигорибонуклеотидов были использованы в качестве аналогов мРНК для фотоаффинной модификации компонентов рибосом человека [15–19].

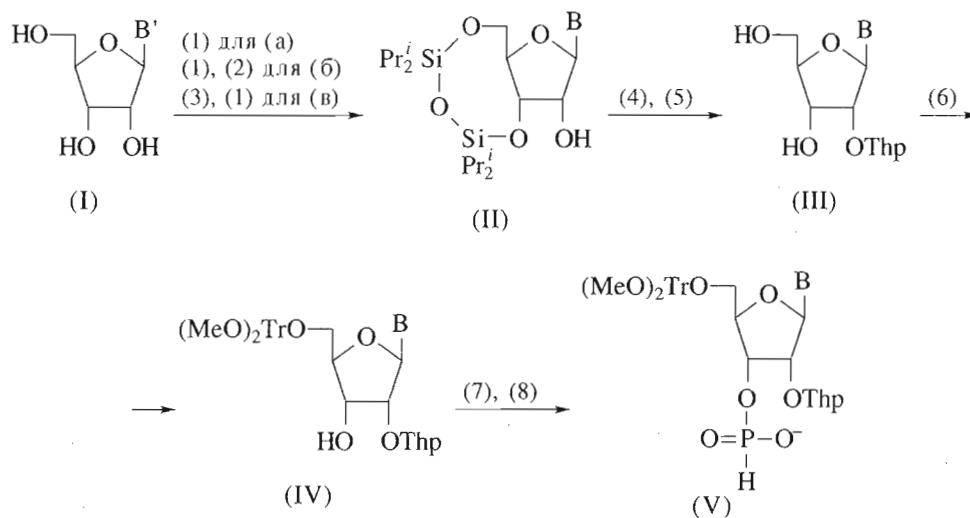
Фотоактивируемые группировки могут быть введены в олигонуклеотиды как по концевым

фосфатам, так и в гетероциклические основания. Химические методы синтеза олигонуклеотидов, модифицированных по гетероциклическому основанию, позволяют регламентировать количество введенных модифицированных нуклеозидов, их тип и расположение в цепи, оставляя при этом концевые гидроксилы свободными для химических и ферментатических манипуляций. Разработанный нами ранее подход к функционализации гетероциклических оснований олигорибонуклеотидов основан на использовании в ходе твердофазного олигонуклеотидного синтеза модифицированного мономерного синтона, содержащего защищенную алифатическую аминогруппу. Удаление этой защитной группы происходило одновременно со стандартным деблокированием олигонуклеотидов [15, 16]. В данной работе для этих целей использован постсинтетический подход [20, 21], основанный на введении в олигомер модифицированного нуклеотида, содержащего в своем гетероцикле “уходящую” группу, стабильную в условиях цикла синтетических операций и заменяемую впоследствии на функциональный линкер. В основном для синтеза модифицированных по гетероциклу олигонуклеотидов используют твердофазный фосфитамидный метод [20–26]. Учитывая простоту и экономичность синтетического цикла *N*-фосфонатного метода, мы использовали этот подход для синтеза модифицированных олигорибонуклеотидов, выбрав при этом в

* Краткое сообщение см. [1].

Сокращения: *Ibu* – изобутирил; *Thr* – тетрагидропиранил; *PivCl* – пивалоилхлорид; *Pu* – пиридин; *EDA* – этилендиамин; *ОФХ* – обращенно-фазовая хроматография; *МПС* – макропористое стекло с определенным размером пор; *НК* – нуклеиновые кислоты. Остальные сокращения соответствуют общепринятым.

[#] Автор для переписки (тел.: (3832) 39-62-75; факс: 33-36-77; e-mail: ven@.niboch.nsc.ru).



B' = 5BrUra (a); 8BrAde (б); 8BrGua (в);

B = 5BrUra (a); 8Br6BzAde (б); 8Br2IbuGua (в)

(1) Pr₂ⁱ(Cl)SiOSi(Cl)Pr₂ⁱ; (2) BzCl; (3) IbuCl; (4) 3,4-дигидро-2H-пиран;

(5) (C₂H₅)₄NBr/KF; (6) (MeO)₂TrCl; (7) Салицилхлорфосфит; (8) H₂O

Схема 1.

качестве “уходящей” группы атом брома в C5- или C8-положении нуклеозида.

получены из соответствующих бромзамещенных нуклеозидов (Ia)–(Iв) по схеме 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бромсодержащие олигорибонуклеотиды были синтезированы с использованием разработанного нами ранее варианта H-фосфонатного метода [27]. Необходимые при этом модифицированные синтоны (Va)–(Vв) – новые представители класса рибонуклеозид-3'-H-фосфонатов – были

Для селективного введения 2'-O-тетрагидропиранильной группы мы использовали временную защитную 3',5'-O-(тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-группировку [28]. Синтез бромсодержащих нуклеозид-3'-H-фосфонатов (Va)–(Vв) был выполнен с помощью монофункционального фосфитирующего реагента салицилхлорфосфита по аналогии с описанным ранее синтезом

Таблица 1. Протокол операций твердофазного H-фосфонатного синтеза модифицированных олигорибонуклеотидов в “ручном” варианте

Номер	Операция	Реагент, растворитель	Время, объем
Цикл присоединения одного нуклеотидного звена			
1.	Деблокирование	1% CHCl ₂ CO ₂ H в CH ₂ Cl ₂	0.5 мл, 2 мин
2.	Промывка	CH ₃ CN	3 × 0.5 мл
3.	Дозирование мономеров и конд. агента	0.05 М раствор нуклеозид-H-фосфоната и 0.25 М раствор PivCl в CH ₃ CN : Py (1 : 1)	по 150 мкл каждого раствора
4.	Конденсация		2 мин
	Повторение операций № 2, 3, 4		
5.	Промывка	CH ₃ CN	3 × 0.5 мл
Окончание синтеза			
1.	Деблокирование	1% CHCl ₂ CO ₂ H в CH ₂ Cl ₂	0.5 мл, 2 мин
2.	Промывка	CH ₃ CN	3 × 0.5 мл
3.	Окисление	0.2 М I ₂ в Py–H ₂ O (98 : 2)	20 мин
4.	Промывка	CH ₃ CN	3 × 0.5 мл

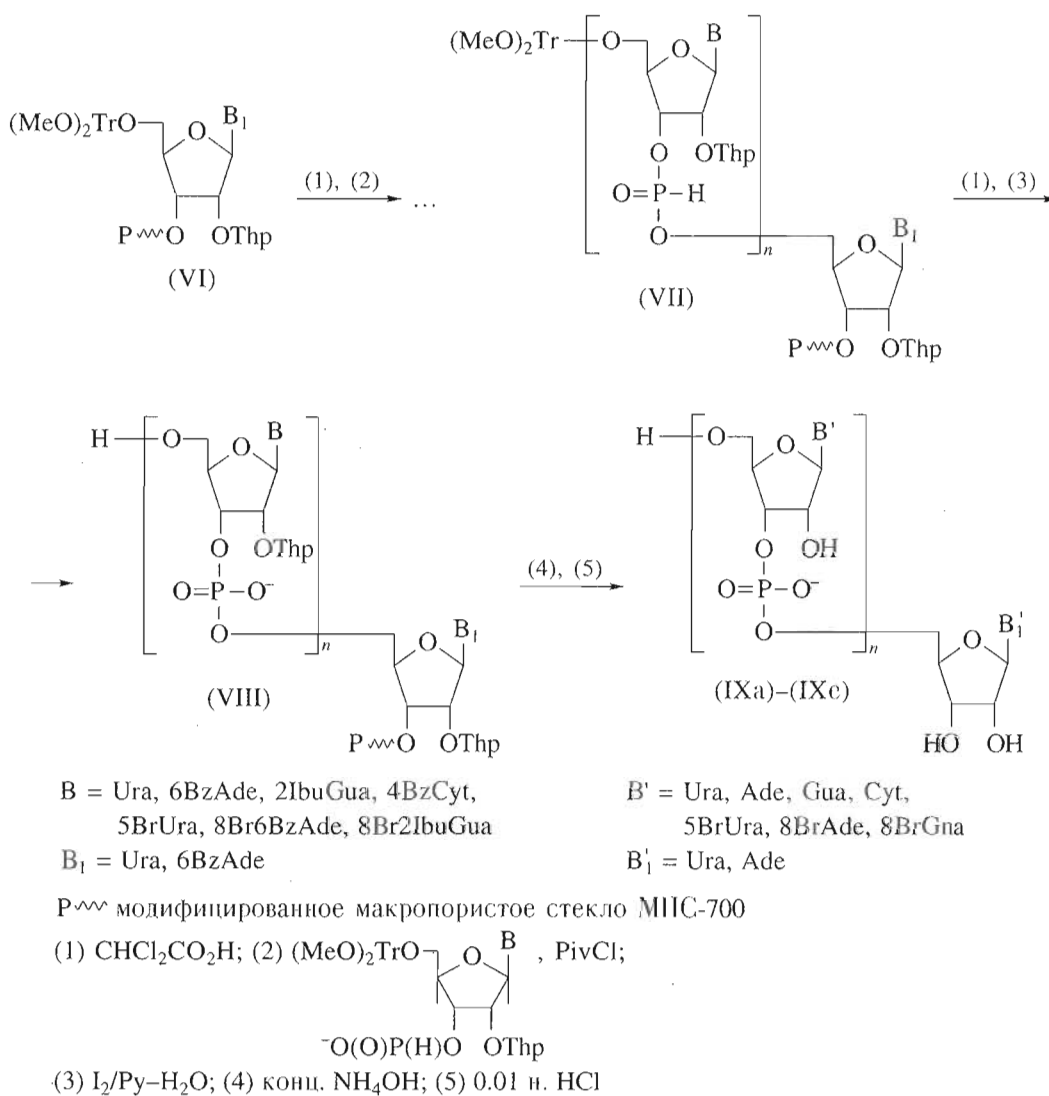


Схема 2.

немодифицированных защищенных рибонуклеозид-3'-*H*-фосфонатов [29]. Структура всех промежуточных и конечных продуктов при этом была подтверждена элементным анализом и данными УФ-, ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектров.

Синтезированные модифицированные мономерные синтоны (Va)–(Vv) были использованы на соответствующих стадиях твердофазного синтеза бромсодержащих олигорибонуклеотидов наряду со стандартными мономерами. Синтез проводили в соответствии с приведенным в табл. 1 протоколом операций по схеме 2.

Критической стадией при выделении бромсодержащих олигомеров является обработка конц. NH_4OH , поскольку в ряде работ [напр., 22–24] отмечено, что при повышенной температуре или при продолжительном воздействии возможно нуклеофильное замещение брома на аминогруппу. Мы

исследовали степень сохранности бромсодержащих рибонуклеозидов (5-бромуридина (Ia), 8-бром-аденозина (Iб) и 8-бромгуанозина (Iв)) при выдерживании их в конц. NH_4OH 16 ч при 56°C и 3 сут при комнатной температуре. По данным аналитической ОФХ (рис. 1) при повышенной температуре 8-бромгуанозин (Iв) оставался неизменным, в то время как в случае нуклеозидов (Ia) и (Iб) наблюдалось образование до 7% 5-аминоуридина и около 30% 8-аминоаденозина, соответственно, причем в последнем случае отмечено также образование неидентифицированных продуктов (до 60%)*; при комнатной температуре происходило образование около 1% 5-аминоуридина и 3% 8-аминоаденозина. Для получения количественных данных в этих модельных экспериментах использовали спе-

* В сообщении [1] по вине авторов приведены ошибочные данные о стабильности 8-бромаденозина в данных условиях.

циально синтезированные аминоксодержащие нуклеозиды-маркеры. Учитывая, что при обработке конц. NH_4OH в течение 3 сут при комнатной температуре происходит также полное удаление олигомера с полимерного носителя и деблокирование гетероциклических оснований, мы использовали данные условия при выделении бромсодержащих олигорибонуклеотидов. Снятие 2'-*O*-тетрагидропиранильных групп и хроматографическое выделение незащищенных бромсодержащих олигорибонуклеотидов проводили в стандартных условиях [27]. Их нуклеотидный состав подтверждали с помощью ферментативного гидролиза с последующим количественным анализом гидролизатов ОФХ. Выходы и характеристики синтезированных бромсодержащих аналогов РНК (IXa)–(IXe) приведены в табл. 2.

Бромсодержащие олигорибонуклеотиды могут быть использованы при проведении фотоиндуцируемых РНК-белковых "сшивок", при рентгеноструктурном анализе и т.д. [4, 30], а также могут служить предшественниками при синтезе олигорибонуклеотидов с различными алифатическими аминоксодержащими линкерами, вводимыми в гетероциклические основания. В частности, этот подход был реализован нами на примере синтеза олигорибонуклеотидов, содержащих в С5- или С8-положениях уридина или аденозина, соответственно, этилендиаминовые линкеры.

В предварительных экспериментах на модельных бромсодержащих нуклеозидах (Ia) и (Iб) было показано, что при действии на них смеси EDA–этанол (1 : 1) в случае 5-бромуридина (Ia) атом брома заменяется на остаток этилендиамина за 4 ч при 37°C, а в случае 8-бромаденозина (Iб) – за 2 ч при 56°C. Дополнительная обработка этих реакционных смесей конц. NH_4OH при комнатной температуре не вносит существенных изменений в эту картину. N^4 -Бензоилцитидин в отличие от N^6 -бензоиладенозина и N^2 -изобутирилгуанозина в используемых нами условиях обработки EDA подвергается переаминированию с образованием до 40% N^4 -(2-аминоэтил)цитидина. Цитидин в этих условиях остается неизменным.

С учетом полученных данных нами разработана соответствующая модификация твердофазного H-фосфонатного синтеза олигорибонуклеотидов (схема 3). Необходимо отметить важность использования 2'-*O*-тетрагидропиранильной защитной группы, позволяющей избежать нежелательного расщепления олигорибонуклеотидов под воздействием алифатических аминов при использовании 2'-*O*-щелочеллабильных защитных групп.

Бромсодержащие защищенные олигорибонуклеотиды (VIII), присоединенные к полимерному носителю, обрабатывали вначале смесью EDA–этанол (1 : 1), а затем избытком конц. NH_4OH в те-

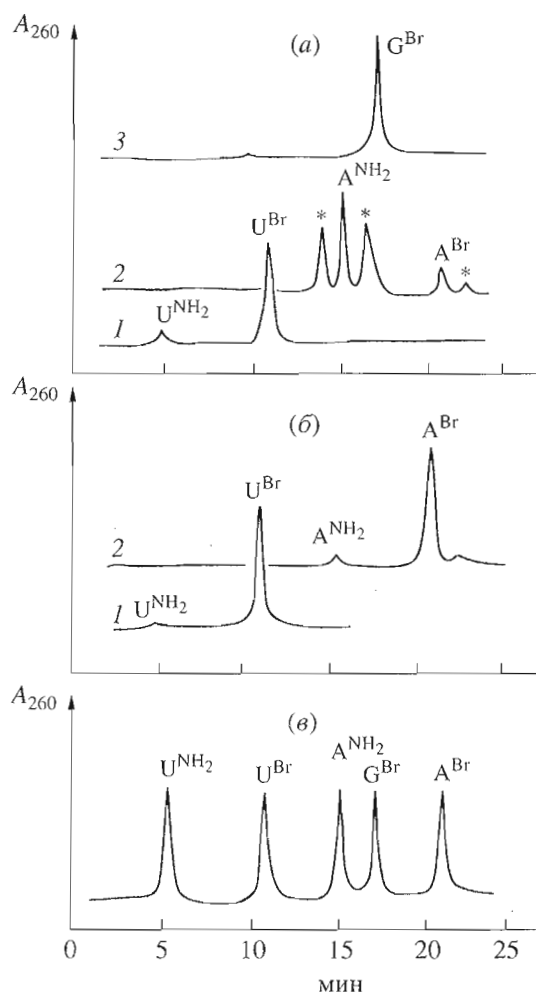


Рис. 1. Аналитическая ОФХ реакционных смесей при выдерживании 5-бромуридина (Ia) (1), 8-бромаденозина (Iб) (2), 8-бромгуанозина (Iв) (3) в конц. NH_4OH : (а) – 16 ч, 56°C (звездочкой отмечены – неидентифицированные продукты); (б) – 3 сут, комнатная температура; (в) – модифицированные нуклеозиды-маркеры (условия хроматографии см. "Эксперимент. часть").

чение 3 сут при комнатной температуре. После нейтрализации и обессоливания 2'-*O*-тетрагидропиранильные группы удаляли и выделяли целевые олигорибонуклеотиды (Xa)–(Xг) и (Xe) хроматографически. При синтезе цитидинсодержащего октарибонуклеотида $\text{CrA}^{\text{LNH}_2}\text{pGrCrUpCrCrA}$ (Xd) обработку EDA проводили после деблокирования оснований и удаления олигомера с полимерного носителя действием конц. NH_4OH .

Гомогенность полученных аминоксодержащих олигорибонуклеотидов (Xa)–(Xe) составляла 95–98% по данным ОФХ; их выходы и характеристики приведены в табл. 2. Нуклеотидный состав бром- и аминоксодержащих олигорибонуклеотидов подтверждали с помощью ферментативного гидролиза и последующего количественного анализа

Таблица 2. Выходы и характеристики олигорибонуклеотидов, содержащих атом брома или алифатическую аминогруппу в гетероциклическом основании (L = -NH(CH₂)₂-)

Олигорибонуклеотид	Выход*, %	Время удерживания, мин	ОФХ ^{2*}				Нуклеотидный состав ^{2*}
			Спектральные соотношения при λ, нм				
			$\frac{250}{260}$	$\frac{270}{260}$	$\frac{280}{260}$	$\frac{290}{260}$	
U ^{Br} pApApA (IXa)	27	11.3	0.76	0.81	0.44	0.19	U ^{Br} : A = 1.0 : 2.9 ^{4*}
U ^{LNH₂} pApApA (Xa)	8(a)	9.3	0.76	0.81	0.44	0.19	U ^{LNH₂} : A = 1.0 : 3.0 ^{4*}
U ^{Br} pUpUpUpUpU (IXб)	13 ^{3*}	9.3	0.74	0.90	0.52	0.20	U ^{Br} : pU = 1.0 : 4.9 ^{5*}
U ^{LNH₂} pUpUpUpUpU (Xб)	8(a)	8.7	0.74	0.90	0.52	0.20	U ^{LNH₂} : pU = 1.0 : 4.9 ^{5*}
UpU ^{Br} pUpGpUpU (IXв)	10	9.9	0.84	0.87	0.53	0.21	U ^{Br} : U : G = 1.1 : 3.9 : 1.0 ^{4*}
UpU ^{LNH₂} pUpGpUpU (Xв)	3(a)	8.5	0.91	0.80	0.46	0.20	U ^{LNH₂} : G : U = 0.8 : 1.0 : 3.7 ^{4*}
A ^{Br} pUpGpUpUpU (IXг)	7	12.3	0.79	0.87	0.49	0.15	A ^{Br} : pU : pG = 1.3 : 4.4 : 1.0 ^{5*} A ^{Br} : U : G = 1.1 : 4.0 : 1.0 ^{4*}
A ^{LNH₂} pUpGpUpUpU (Xг)	6(a)	11.4	0.79	0.87	0.49	0.15	A ^{LNH₂} : pU : pG = 1.3 : 4.4 : 1.0 ^{5*} A ^{LNH₂} : U : G = 1.1 : 4.0 : 1.0 ^{4*}
CpA ^{Br} pGpCpUpCpCpA (IXд)	10	8.2	0.81	0.97	0.69	0.32	A ^{Br} : C : U : G : A = = 0.8 : 3.8 : 1.1 : 1.0 : 1.2 ^{4*}
CpA ^{LNH₂} pGpCpUpCpCpA (Xд)	7(б)	10.3	0.81	1.01	0.79	0.43	A ^{LNH₂} : C : U : G : A = = 1.0 : 4.0 : 1.3 : 1.1 : 1.2 ^{4*}
ApUpG ^{Br} pUpUpU (IXе)	17	10.0	0.77	0.84	0.43	0.15	pG ^{Br} : pU : A = 1.0 : 4.0 : 1.0 ^{5*}
U ^{LNH₂} pUpUpGpUpU (Xe)	3(a)	7.9	0.88	0.84	0.50	0.22	U ^{LNH₂} : G : U = 0.8 : 1.0 : 4.1 ^{4*}

* Приведен выход после двух хроматографий в расчете на первый нуклеозид, присоединенный к полимеру; условия (a) и (б) см. "Эксперимент. часть".

^{2*} Условия см. "Эксперимент. часть".

^{3*} Обработка конц. NH₄OH 1 ч, комнатная температура.

^{4*} Нуклеаза P1 + щелочная фосфатаза *E. coli*; условия см. "Эксперимент. часть".

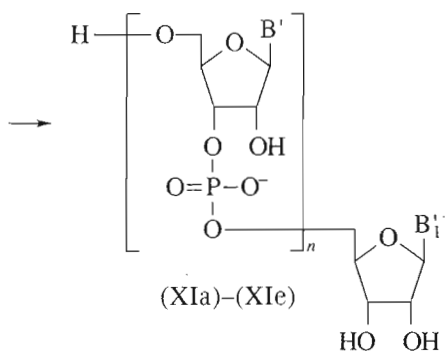
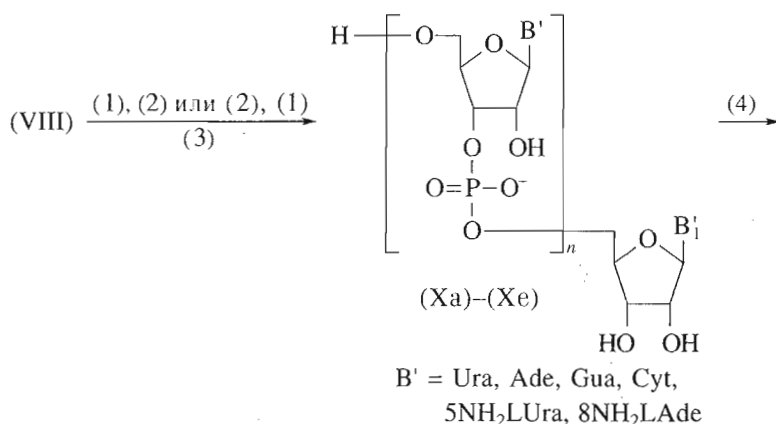
^{5*} Нуклеаза P1; условия см. "Эксперимент. часть".

Таблица 3. Выходы и характеристики олигорибонуклеотидов, содержащих *n*-азидотетрафторбензамидную группу в гетероциклическом основании (обозначения как в табл. 2)

Олигорибонуклеотид	Выход, %*	ОФХ ^{2*}				
		время удерживания, мин	$\frac{250}{260}$	$\frac{270}{260}$	$\frac{280}{260}$	$\frac{290}{260}$
U ^{LNR} pApApA (XIa)	82	11.0	0.90	0.70	0.31	0.14
U ^{LNR} pUpUpUpUpU (XIб)	60	10.8	0.87	0.76	0.35	0.14
UpU ^{LNR} pUpGpUpU (XIв)	71	9.8	0.90	0.80	0.44	0.11
A ^{LNR} pUpGpUpUpU (XIг)	79	13.0	0.80	0.90	0.61	0.29
CpA ^{LNR} pGpCpUpCpCpA (XIд)	56	13.2	0.86	0.94	0.68	0.31
U ^{LNR} pUpUpGpUpU (XIе)	56	9.5	0.87	0.83	0.51	0.23

* Приведен выход после обращенно-фазовой ВЭЖХ в расчете на исходный аминоксодержащий олигонуклеотид.

^{2*} Условия см. "Эксперимент. часть".



$B' = \text{Ura, Ade, Gua, Cyt, } 5\text{RNHLUra, } 8\text{RNHLAde}$

$L = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$

(1) $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$; (2) конц. NH_4OH ; (3) 0.01 н. HCl ;

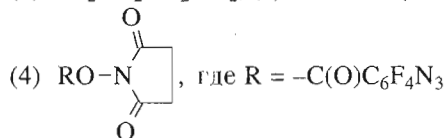


Схема 3.

гидролизатов ОФХ с использованием значений молярных коэффициентов поглощения специально синтезированных нуклеозидов-маркеров (табл. 2).

Использование различных алифатических диаминов в рамках данного подхода позволит получать из одного бромсодержащего олигонуклеотида-предшественника семейство аминокислотсодержащих олигонуклеотидов, отличающихся только строением введенного аминокислотного остатка.

Наличие алифатической аминогруппы с высокой нуклеофильностью позволяет легко вводить в состав олигонуклеотида группировки различной химической природы. В данной работе это продемонстрировано на примере синтеза новых типов фотоактивируемых производных олигорибонуклеотидов. Ацилирование незащищенных аминокислот- и аденозинсодержащих олигорибонуклеотидов (Xa)-(Xe) *N*-оксисукцинимид-

ным эфиром *n*-азидотетрафторбензойной кислоты в водно-органической среде (рН 9) (схема 3) проходило за 1.5 ч на 60–80%. Все полученные соединения при офВЭЖХ элюировались буфером с более высокой концентрацией ацетонитрила по сравнению с соответствующим исходным аминокислотсодержащим олигонуклеотидом, что свидетельствовало о присоединении гидрофобной группы. На рис. 2 в качестве примера приведены профили ВЭЖХ при выделении соответствующих производных октарыбонуклеотида SrArGrCrUrCrSrA . Гомогенность синтезированных перфторарилазидных производных олигорибонуклеотидов (XIa)-(XIe) составляла, по данным аналитической ОФХ, 92–97%; их выходы и характеристики приведены в табл. 3.

Изучение комплексобразующих свойств синтезированных фотоактивируемых производных

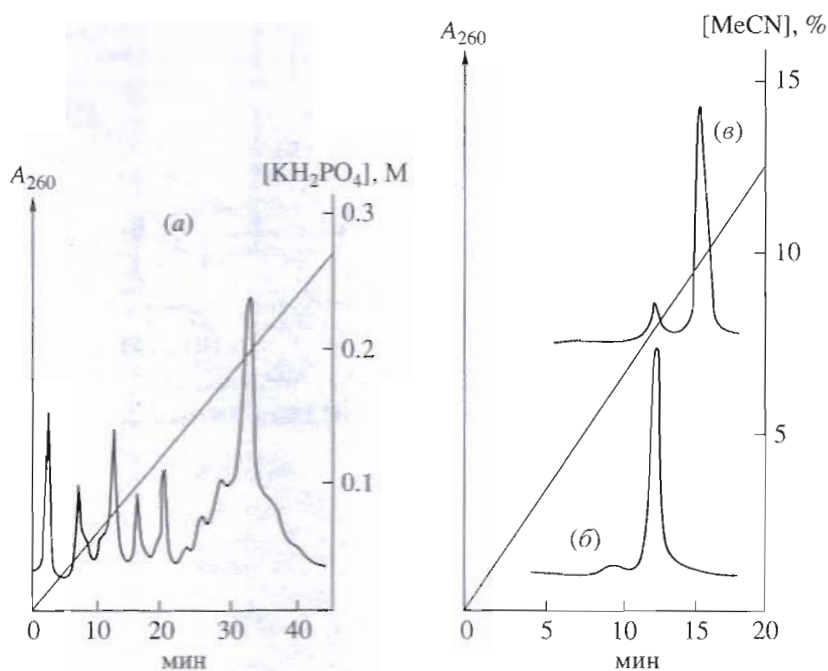


Рис. 2. Ионообменная ВЭЖХ реакционной смеси при синтезе $\text{SrA}^{\text{LNH}_2}\text{-pGpCrUpCrSrA}$ (Xд) (а); обращенно-фазовая ВЭЖХ $\text{SrA}^{\text{LNH}_2}\text{-pGpCrUpCrSrA}$ (Xд) (б) и $\text{SrA}^{\text{LNHR}}\text{-pGpCrUpCrSrA}$ (Xлд) (в) (условия хроматографии см. "Эксперимент. часть").

олигорибонуклеотидов и их применение для сайт-специфической фотомодификации НК предмет наших дальнейших исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы рибонуклеозиды (Reanal, Венгрия), пивалоилхлорид, дихлоруксусная кислота, 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопротил-1,3-дисиноксан, диэтилпирокарбонат, 3,4-дигидро-2H-пиран, треххлористый фосфор (Fluka, Швейцария), этилендиамин (Merck, Германия), другие реактивы и растворители квалификации "х. ч." и "ос. ч." отечественного производства. Салицилхлорфосфит получали по методике [31]. N-Оксисукцинимидный эфир n-азидотетрафторбензойной кислоты синтезирован Т.А. Приходько как описано в работе [32]. 5'-O-Диметокситри-тил-2'-O-тетрагидропиранил-N-ацилрибонуклеозиды и их 3'-H-фосфонаты синтезировали по описанным методикам [28].

Для ТСХ использовали пластинки DC-Alufo-lien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) и системы растворителей: этанол-хлороформ, 1 : 9 (А); этанол-хлороформ, 0.5 : 9.5 (Б); этанол-хлороформ, 0.1 : 9.9 (В); этанол-хлороформ, 3 : 7 (Г); этанол-хлороформ-триэтиламин, 4 : 5.9 : 0.1 (Д). Колоночную адсорбционную хроматографию проводили на Silica gel 60 (230–400 меш) (Fluka, Швейцария).

Для ионообменной хроматографии использовали Dowex 50W × 2 (200–400 меш) (Serva, Германия).

Для определения нуклеозидного состава олигонуклеотидов применяли нуклеазу P1 *Penicillium citrinum* (КФ 3.1.30.1) (Sigma, США) и щелочную фосфатазу *E. coli* (КФ 3.1.3.1) (НПО "Биолар", Латвия).

В качестве полимерного носителя для твердофазного синтеза использовали аминопропилированное макропористое стекло МПС-700 (НПФ "Теор. практика", Россия). Модификацию носителя и присоединение первого нуклеозидного звена проводили по [27]. Удельная емкость нуклеозид-связанного носителя, измеренная по диметокситри-тильному катиону, составляла 40–56 мкмоль/г.

Препаративную ВЭЖХ деблокированных олигонуклеотидов и их производных осуществляли на хроматографе Waters (США), используя для ионообменной хроматографии колонку (4.6 × 250 мм) с Полисил-СА (НПФ "Теор. практика", Россия), элюирование проводили в градиенте концентрации KH_2PO_4 (0–0.3 М, pH 6.5) в 30% ацетонитриле за 50 мин; скорость 2 мл/мин. Для ОФХ использовали колонку (4.6 × 250 мм) с LiChrosorb RP-18 (Merck, Германия) и градиент концентрации ацетонитрила (0–20%) в 0.05 М растворе LiClO_4 за 30 мин; скорость элюции 2 мл/мин. Выделение олигонуклеотидов в форме литиевой соли осуще-

ствляли путем осаждения из водного раствора в 2% раствор LiClO_4 в ацетоне.

Аналитическую ОФХ проводили на хроматографе "Милихром" (Россия), используя колонку (2 × 62 мм) с Nucleosil C-18 (5 мкм, Macherey-Nagel, Германия) в градиенте концентрации ацетонитрила (0–25%) в 0.05 М LiClO_4 (скорость потока 100 мкл/мин). Количественные хроматографические данные в режиме детекции на шести длинах волн со спектрофотометрического детектора хроматографа "Милихром" были получены и обработаны с помощью IBM PC-486.

Молярные коэффициенты поглощения немодифицированных олигонуклеотидов при 260 нм рассчитывали по данным работы [33]. Молярные коэффициенты поглощения 8-[N-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоил)-2-аминоэтил]аминоаденозина или 5-[N-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоил)-2-аминоэтил]аминоуридина считали равными сумме значений молярных коэффициентов поглощения, соответственно, 8-[N-(2-аминоэтил)]аминоаденозина и 5-[N-(2-аминоэтил)]аминоуридина и величины $23200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для $\text{N}_3\text{C}_6\text{F}_4\text{CO}$ -группы [34].

УФ-спектры соединений регистрировали на спектрофотометре Specord UV-VIS (Германия). Спектры ^{31}P - и ^1H -ЯМР (81.015 и 200.132 МГц, соответственно) записывали на спектрометре WP-200 (Bruker, Германия). Химические сдвиги в ^{31}P -ЯМР-спектрах приведены в миллионных долях относительно сигнала 85% ортофосфорной кислоты (внешний стандарт). Спектры записывали с подавлением спин-спинового взаимодействия ^{31}P - ^1H и без него. В качестве внутреннего стандарта в ^1H -ЯМР-спектрах использовали CDCl_3 (δ 7.24 м.д.).

5-Бромуридин (Ia) получали по методу [35] с выходом 65%. Аналитически чистый образец получали кристаллизацией из абс. этанола. Гомогенность 99% (ОФХ). Спектральные соотношения: 250/260 0.54; 270/260 1.60; 280/260 1.89; 290/260 1.52. УФ (H_2O), нм (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): λ_{max}^1 210 (9600); λ_{max}^2 280 (9000); λ_{min} 243 (1900); λ 260 (4400) ([36]: λ_{max} 279 (9600)). Найдено, %: Br 24.8. $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_6\text{Br}$. Вычислено, %: 24.7. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 8.58 (1H, с, H6); 5.91 (1H, д, J 1 Гц, H1'); 4.21 (2H, м, J 1 Гц, H2', H3'); 4.06 (1H, уш.с, H4'); 3.83 (2H, кв, H5').

5-Аминоуридин [36]. Суспензию 5-бромуридина (Ia) (0.6 г, 1.9 ммоль) в 5 мл абс. диметилформамида (DMF) добавляли к 5 мл жидкого аммиака и выдерживали 2 сут при комнатной температуре (контроль – ТСХ, система А). После дегазирования к реакционной смеси добавляли 100 мл эфира, выпавший осадок отделяли, сушили, добавляли к нему 5 мл абс. пиридина и отделяли нерастворившийся остаток. К полученному раствору добавляли 100 мл эфира, выпавший осадок 5-аминоуридина отделяли, сушили и дважды переосаждали из раствора в метаноле в эфир. Выход 5-ами-

ноуридина 0.4 г (83%). Гомогенность 95% (ОФХ). Спектральные соотношения: 250/260 1.11; 270/260 1.36; 280/260 1.77; 290/260 1.90. УФ-спектр (H_2O), нм (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): λ_{max}^1 232; λ_{max}^2 288; λ_{min} 258 ([36]: λ_{max} 294 (7400)). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.27 (1H, с, H6); 5.88 (1H, д, J 1.5 Гц, H1'); 4.26–4.16 (2H, м, J 1 Гц, H2', H3'); 4.04 (1H, м, H4'); 3.80 (2H, м, H5').

5-[N-(2-Аминоэтил)]аминоуридин (по аналогии с [37]). К суспензии 5-бромуридина (Ia) (0.2 г, 0.6 ммоль) в 2 мл абс. метанола добавляли 1 мл (14.9 ммоль) EDA и перемешивали при комнатной температуре 1 ч (контроль – ТСХ, система Б). После окончания реакции реакционную смесь частично упаривали и к оставшемуся раствору добавляли 20 мл эфира. Образовавшийся маслообразный остаток несколько раз промывали эфиром для удаления избытка EDA, растворяли в 100 мл воды, доводили pH до 3 муравьиной кислотой, наносили на колонку с дауэксом 50W × 2 в H^+ -форме (25 мл), промывали 300 мл воды и аминопроизводное уридина элюировали 1.5 н. конц. NH_4OH (300 мл). Раствор упаривали досуха, оставшееся масло растирали с эфиром до начала кристаллизации. Выход целевого соединения 0.075 г (40%). Гомогенность 93% (ОФХ). Спектральные соотношения: 250/260 1.51; 270/260 0.82; 280/260 1.03; 290/260 1.38. УФ (H_2O), нм (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): λ_{max}^1 238 (4000); λ_{max}^2 300 (4900); λ_{min} 268 (2800); λ 260 (3000). Найдено, %: C 43.29; H 5.90; N 18.61. $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6$. Вычислено, %: C 43.40; H 6.00; N 18.50. ^1H -ЯМР ($[\text{D}_2\text{O}]_2$): 7.15 (1H, с, H6); 6.05 (1H, д, J 1 Гц, H1'); 4.36 (2H, м, J 1 Гц, H2', H3'); 4.18 (1H, м, H4'); 3.93 (2H, м, H5'); 3.23 – 3.17 (метиленовые протоны фрагмента – $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$).

2'-O-Тетрагидропиридил-5-бромуридин (IIa) (по аналогии с [28]). 5-Бромуридин (Ia) (4.7 г, 14.5 ммоль) упаривали с абс. пиридином и добавляли 15 мл абс. пиридина и 5.3 мл (5.3 г, 17.4 ммоль) 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопронил-1,3-дисулксана. Через 4 ч (контроль – ТСХ, система А) реакционную смесь упаривали до объема около 5 мл, добавляли 15 мл H_2O и экстрагировали хлороформом. Объединенные органические слои сушили Na_2SO_4 и упаривали. После хроматографии на силикагеле с использованием линейного градиента концентрации этанола в хлороформе (0–10%) выход 3',5'-O-(тетраизопронилдисулксан-1,3-диил)-5-бромуридина (IIa) составлял 8.0 г (97%). R_f 0.55 (А). Гомогенность 93% (ОФХ).

К раствору 8.0 г (14.1 ммоль) производного 5-бромуридина (IIa) в 90 мл сухого хлороформа добавляли 0.3 г (1.8 ммоль) моногидрата *n*-толуолсульфокислоты, 6 мл (4.8 г, 66.1 ммоль) свежеперегнанного 3,4-дигидро-2H-пирана и выдерживали реакционную смесь 4 ч при комнатной температуре (контроль – ТСХ, система Б). К реакционной смеси добавляли 1.2 мл триэтиламина и 70 мл на-

сыщенного водного раствора NaHCO_3 , органический слой отделяли, водный слой экстрагировали хлороформом, объединенные органические слои сушили Na_2SO_4 . Маслообразный остаток 2'-*O*-тетрагидропиранил-3',5'-*O*-(тетраизопропилдисилоксан-1,3-диил)-5-бромуридина (IIa) после упаривания растворяли в 170 мл ацетонитрила, добавляли 16.7 г (79.4 ммоль) тетраэтиламмоний бромид и 16.7 мл 5 н. водного раствора KF и перемешивали реакционную смесь 1 ч при 60°C (контроль – ТСХ, система В). Далее реакционную смесь упаривали досуха и добавляли равные объемы воды и хлороформа. После экстракции вещество хроматографировали на силикагеле, используя для элюции линейный градиент концентрации этанола (0–5%) в хлороформе. Выход 2'-*O*-тетрагидропиранил-5-бромуридина (IIIa) (в виде смеси двух диастереомеров) составлял 5.1 г (86% в расчете на исходный 5-бромуридин (Ia)). R_f 0.28 и 0.32 (В). В аналитических целях для получения чистых диастереомеров проводили повторную хроматографию на силикагеле. ^1H -ЯМР (менее хроматографически подвижный диастереомер), (CDCl_3): 8.54 (1H, с, H6); 6.07 (1H, д, J 1.0 Гц, H1'); 4.6 (1H, уш.с, ацетальный протон Thr); 4.31 (2H, м, J 1.0 Гц, H2',3'); 4.06 (1H, уш.с, H4'); 3.56 (2H, м, J 1.0 Гц, H5'); 1.55–1.74 (8H, м, CH_2 в Thr-группе).

5'-*O*-Диметокситритил-2'-*O*-тетрагидропиранил-5-бромуридин (IVa) синтезировали в стандартных условиях исходя из 5.0 г (12.3 ммоль) смеси диастереомеров 2'-*O*-тетрагидропиранил-5-бромуридина (IIIa) и 5.5 г (14.8 ммоль) диметокситритилхлорида. После хроматографии на силикагеле с использованием линейного градиента концентрации этанола (0–5%) в хлороформе, содержащем 0.01% ТЕА, выход соединения (IVa) (в виде смеси двух диастереомеров) составлял 6.2 г (71%). R_f 0.39 и 0.43 (Б).

8-Бромаденозин (Iб) получали по [38]. Выход 0.9 г (70%). Гомогенность 95% (ОФХ). Спектральные соотношения: 250/260 0.63; 270/260 1.04; 280/260 0.57; 290/260 0.12. УФ (этанол), нм (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): λ_{max}^1 215 (18400); λ_{max}^2 265 (14800); λ_{min} 230 (3000). Найдено, %: С 34.51; Н 3.53; N 20.0; Br 23.18. $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_4\text{Br}$. Вычислено, %: С 34.7; Н 3.49; N 20.23; Br 23.08.

8-Аминоадеозин получали по [39]. Выход 0.05 г (50%). Гомогенность 99% (ОФХ). Спектральные соотношения: 250/260 0.59; 270/260 1.21; 280/260 1.06; 290/260 0.42. УФ (H_2O), нм: λ_{max}^1 210; λ_{max}^2 271; λ_{min} 231. ^1H -ЯМР (D_2O): 8.15 (1H, с, H2); 6.05 (1H, д, J 5 Гц, H1'); 4.82 (1H, м, H2' или H3'); 3.6 (2H, м, H5'); 4.35 (1H, м, H3' или H2').

8-[*N*-(2-Аминоэтил)]аминоадеозин получали по аналогии с [37]. 8-Бромаденозин (Iб) (1 г, 2.9 ммоль) суспендировали в 10 мл абс. этанола, добавляли 7 мл (6.3 г, 105 ммоль) EDA и нагревали при 85°C

в течение 1 ч. Контроль – ТСХ, система А. После охлаждения реакционную смесь упаривали до маслообразного остатка, промывали эфиром и сушили на воздухе. Остаток растворяли в 50 мл воды, доводили pH до 3 муравьиной кислотой, наносили на колонку с дауэксом 50W \times 2 в H^+ -форме (50 мл), промывали водой (0.5 л) и элюировали продукт 1.5 н. NH_4OH (2 \times 300 мл), аммиачный раствор упаривали досуха. Продукт выделяли из остатка многократной обработкой последнего абс. пиридином, который затем упаривали до малого объема и добавляли 50 мл эфира. Осадок отделяли, следы пиридина удаляли упариванием с толуолом, остаток растворяли в метаноле и осаждали эфиром. Выход 8-[*N*-(2-аминоэтил)]аминоадеозина 0.4 г (50%). Т. пл. 157–160°C. Гомогенность 95% (ОФХ). Спектральные соотношения: 250/260 0.51; 270/260 1.38; 280/260 1.43; 290/260 0.86. УФ (H_2O), нм (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): λ_{max}^1 213 (26000); λ_{max}^2 277 (15200); λ_{min} 236 (3400); λ 260 (10000). Найдено, %: С 44.36; Н 6.00; N 29.92. $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_4$. Вычислено, %: С 44.30; Н 5.89; N 30.12. ^1H -ЯМР (D_2O): 7.90 (1H, с, H2); 5.92 (1H, д, J 5 Гц, H1'); 4.34 (1H, м, H2' или H3'); 4.21 (1H, м, H3' или H2'); 3.85 (2H, с, H5'); 3.39, 2.84 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$).

2'-*O*-Тетрагидропиранил-*N*⁶-бензоил-8-бромаденозин (IIIб) в виде смеси двух диастереомеров синтезировали по методике работы [16]. После нескольких рехроматографий выход составлял 22% (в расчете на исходный (Iб)). R_f 0.24 и 0.27 (В). Гомогенность 91% (ОФХ). Спектральные соотношения: 250/260 1.47; 270/260 0.71; 280/260 0.76; 290/260 1.12. УФ (этанол), нм (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): λ_{max} 300 (14000); λ_{min} 270 (7000). ^1H -ЯМР (смесь диастереомеров) (CDCl_3): 8.95 (1H, с, NHCO); 8.61 (1H, с, H2); 7.98 (2H, м, COC_6H_5); 7.53 (3H, м, COC_6H_5); 6.00 (1H, д, J 5 Гц, H1'); 5.38 (1H, м, H2' или H3'); 4.53 (1H, м, H3' или H2'); 4.43 (1H, м, H4'); 4.28 (1H, с, ацетальный протон Thr); 3.85 (4H, м, OCH_2 в Thr-группе и H5'); 1.6 (6H, м, CH_2 в Thr-группе).

5'-*O*-Диметокситритил-2'-*O*-тетрагидропиранил-*N*⁶-бензоил-8-броиаденозин (IVб) синтезировали исходя из 1 г (1.9 ммоль) 2'-*O*-тетрагидропиранил-*N*⁶-бензоил-8-бромаденозина (IIIб) и 0.7 г (2.1 ммоль) диметокситритилхлорида [16]. После хроматографии на силикагеле выход соединения (IVб) (в виде смеси двух диастереомеров) составлял 1.4 г (93%). R_f 0.52 и 0.54 (Б).

8-Бромгуанозин (Iв) получали по методу [40] с выходом 72%. $T_{\text{разл}}$ 200–205°C. Гомогенность 93% (ОФХ). Спектральные соотношения: 250/260 0.81; 270/260 0.90; 280/260 0.72; 290/260 0.41. УФ (H_2O), нм (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): λ_{max} 262 (15600); λ_{min} 226 (3800); λ 260 (15300). Найдено, %: Br 21.45. Вычислено, %: Br 22.00. ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 10.89 (1H, уш.с, NH); 6.53 (2H, уш.с, NH_2); 5.68 (1H, д,

J 1.5 Гц, $H1'$); 5.50 (1H, уш.с, $H2'$); 5.17–4.99 (2H, м, 3'- и 5'-ОН); 4.14 (1H, м, $H3'$); 3.87 (1H, м, $H4'$).

2'-О-Тетрагидропиранил- N^2 -изобутирил-8-бромгуанозин (IIIв) получали по аналогии с [28]. 8-Бромгуанозин (Iв) (1.5 г, 4.1 ммоль) растворяли в 25 мл абс. пиридина и при интенсивном перемешивании и охлаждении добавляли 4.1 мл (3.5 г, 50.6 ммоль) триметилхлорсилана. Через 15 мин к реакционной смеси добавляли 1.4 мл (1.4 г, 13.4 ммоль) изобутирилхлорида. Перемешивание продолжали 2 ч при комнатной температуре (контроль – ТСХ, система А). В реакционную смесь добавляли 100 мл воды со льдом, нейтрализовали водным аммиаком и продукт экстрагировали хлороформом (15 мл \times 4). Растворитель упаривали досуха, оставшееся масло растворяли в 10 мл хлороформа и экстрагировали водой (15 мл \times 5). Водный раствор охлаждали, отделяли выпавший осадок N^2 -изобутирил-8-бромгуанозина, сушили до постоянного веса (1.1 г, 62%) и использовали далее в синтезе без дополнительной очистки.

N^2 -Изобутирил-8-бромгуанозин (0.4 г, 0.9 ммоль) упаривали с абс. пиридином (3 \times 3 мл), добавляли 3 мл абс. пиридина и 0.3 мл (1.0 ммоль) 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопрпил-1,3-дисилоксана. Через 6 ч (контроль – ТСХ, система А) реакционную смесь упаривали до малого объема, добавляли 1 мл воды и экстрагировали хлороформом. После хроматографии на силикагеле выход 3',5'- O -(тетраизопрпилдисилоксан-1,3-диил)- N^2 -изобутирил-8-бромгуанозина (IIв) составлял 0.5 г (83%). R_f 0.75 (А).

К раствору 0.5 г (0.7 ммоль) соединения (IIв) в 3 мл сухого хлороформа добавляли 0.8 г (3.3 ммоль) пиридиниевой соли n -толуолсульфокислоты и 1.2 мл (13.2 ммоль) свежеперегнанного 3,4-дигидро-2H-пирана и выдерживали реакционную смесь 48 ч при комнатной температуре (контроль – ТСХ, система Б). Дальнейшую обработку и хроматографию проводили аналогично описанному для соединения (IIIа). Выход 2'- O -тетрагидропиранил- N^2 -изобутирил-8-бромгуанозина (IIIв) (в виде смеси двух диастереомеров) составлял 0.5 г (65% в расчете на исходный (Iв)). R_f 0.38 и 0.42 (В). В аналитических целях для получения чистых диастереомеров (IIIв) проводили повторную хроматографию. Найдено, %: С 43.97; Н 5.17; N 13.48; Br 14.8. $C_{19}H_{26}N_5O_7Br$. Вычислено, %: С 44.2; Н 5.1; N 13.5; Br 15.4. 1H -ЯМР (более хроматографически подвижный диастереомер), ($[^2H_4]$ метанол): 6.13 (1H, д, J 1.0 Гц, $H1'$); 5.22 (1H, т, $H2'$); 4.62–4.69 (2H, м, J 1.0 Гц, $H3',4'$); 3.88 (2H, м, $H5'$); 3.26 (1H, м, ацетальный протон Thr); 2.8 (1H, м, CH, Iбу); 1.49–1.76 (8H, м, CH_2 в Thr-группе); 1.26 (6H, д, CH_3).

5'-О-Диметокситритил-2'-О-тетрагидропиранил- N^2 -изобутирил-8-бромгуанозин (IVв) синтезировали в стандартных условиях исходя из 0.4 г (0.8 ммоль) 2'- O -тетрагидропиранил- N^2 -изобутирил-8-бромгуанозина (IIIв) и 0.3 г (1.0 ммоль) диметокситритилхлорида. После хроматографии на

силикагеле выход соединения (IVв) (в виде смеси двух диастереомеров) составлял 0.3 г (48%). R_f 0.42 и 0.46 (Б).

Бромсодержащие защищенные рибонуклеозид-3'- H -фосфонаты (Va)–(Vv) синтезировали исходя из смеси диастереомеров 5'- O -диметокситритил-2'- O -тетрагидропиранил- N -ацил-бромсодержащих рибонуклеозидов и салицилхлорфосфита по аналогии с [29].

5'-О-Диметокситритил-2'-О-тетрагидропиранил-5-бромуридин-3'- H -фосфонат (Va). Выход 82%. R_f 0.40 (Д). ^{31}P -ЯМР (Py: CH_3CN): 1.9; 2.1 ($^1J_{P,H}$ 610 Гц).

5'-О-Диметокситритил-2'-О-тетрагидропиранил- N^6 -бензоил-8-бромаденозин-3'- H -фосфонат (Vб). Выход 83%. R_f 0.30 (Д). ^{31}P -ЯМР (Py: CH_3CN): 2.0; 2.2 ($^1J_{P,H}$ 610 Гц) [16].

5'-О-Диметокситритил-2'-О-тетрагидропиранил- N^2 -изобутирил-8-бромгуанозин-3'- H -фосфонат (Vв). Выход 92%. R_f 0.30 (Д). ^{31}P -ЯМР (Py: CH_3CN): 1.9; 2.0 ($^1J_{P,H}$ 610 Гц).

Поведение рибонуклеозидов в модельных условиях. Стабильность бромсодержащих рибонуклеозидов (Iа)–(Iв) в конц. NH_4OH проверяли, выдерживая их 16 ч при 56°C или 3 сут при комнатной температуре, упаривали досуха, растворяли в воде и анализировали методом ОФХ (рис. 1).

Взаимодействие бромсодержащих нуклеозидов с этилендиамином. 1). 5-Бромуридин (Iа) или 8-бромаденозин (Iб) растворяли в смеси EDA–этанол (1 : 1) и выдерживали при 37 или 56°C. Через каждые 30 мин после начала реакции из реакционной смеси отбирали аликвоту, разбавляли водой, нейтрализовали уксусной кислотой и анализировали ОФХ.

2). 5-Бромуридин (Iа) или 8-бромаденозин (Iб) выдерживали в смеси EDA–этанол (1 : 1) 4 ч при 37°C или 2 ч при 56°C соответственно. К реакционной смеси добавляли избыток конц. NH_4OH , выдерживали 3 сут при комнатной температуре, упаривали несколько раз с этанолом, растворяли в воде, нейтрализовали уксусной кислотой и анализировали ОФХ.

Взаимодействие N -ацилрибонуклеозидов с этилендиамином и конц. NH_4OH . 1). N -Ацилрибонуклеозиды (N^4 -бензоилцитидин, N^6 -бензоиладенозин, N^2 -изобутирилгуанозин) обрабатывали смесью EDA–этанол (1 : 1) 2 ч при 56°C, разбавляли водой, нейтрализовали уксусной кислотой и анализировали ОФХ.

2). Цитидин обрабатывали EDA и анализировали как описано выше.

3). N -Ацилрибонуклеозиды выдерживали в конц. NH_4OH 3 сут при комнатной температуре, упаривали, растворяли в воде и анализировали ТСХ (система Г).

Бромсодержащие олигорибонуклеотиды синтезировали в колонке с пористым фильтром в

масштабе 2–5 мкмоль полимерсвязанного первого нуклеозида, используя в качестве синтонов наряду со стандартными защищенными рибонуклеозид-3'-*H*-фосфонатами модифицированные синтоны (Va)–(Vv) (протокол операций см. табл. 1). Полимерсвязанный защищенный бромсодержащий олигорибонуклеотид выдерживали с конц. NH_4OH 3 сут при комнатной температуре и упаривали. Удаление 2'-*O*-тетрагидропиранильных групп и хроматографическое выделение бромсодержащих олигомеров проводили в стандартных условиях [27]. Выходы и характеристики бромсодержащих олигонуклеотидов (IXa)–(IXe) приведены в табл. 2.

Олигорибонуклеотиды, содержащие алифатическую аминогруппу в гетероцикле (Xa)–(Xe). Защищенный бромсодержащий олигорибонуклеотид, присоединенный к полимерному носителю, полученный в соответствии с приведенным в табл. 1 протоколом операций, обрабатывали в условиях (a) или (б):

а) выдерживали 4 ч в 200 мкл смеси EDA–этанол (1 : 1) при 37°C для 5-бромуридинсодержащих олигорибонуклеотидов или 2 ч при 56°C для 8-бром-аденозинсодержащих олигомеров и проводили обработку избытком конц. NH_4OH 3 сут при комнатной температуре. Раствор декантировали, полимер промывали водным этанолом и водой, объединенные супернатанты упаривали досуха, остаток растворяли в воде, нейтрализовали 0.2 н. HCl , обессоливали на Sep-Pak C18 Cartridge (Millipore, США), промывая сначала водой, затем 50% водным ацетонитрилом и упаривали;

б) выдерживали с конц. NH_4OH 3 сут при комнатной температуре, раствор декантировали, полимер промывали водным этанолом и водой, упаривали досуха. К остатку добавляли 200 мкл смеси EDA–этанол (1 : 1) и выдерживали в условиях, приведенных в (a). Реакционную смесь упаривали несколько раз с добавлением этанола, остаток растворяли в воде, нейтрализовали 0.2 н. HCl и проводили обессоливание.

Удаление 2'-*O*-тетрагидропиранильных групп и хроматографическое выделение модифицированных олигорибонуклеотидов проводили в стандартных условиях [27].

Выходы и характеристики модифицированных олигонуклеотидов (Xa)–(Xe) приведены в табл. 2.

Анализ нуклеозидного состава олигорибонуклеотидов. а) К 0.5 OE_{260} олигонуклеотида в 22 мкл воды добавляли 3 мкл буфера (0.03 М NaOAc , 1 мМ ZnSO_4 , pH 5.2) и 5 мкл нуклеазы P1 в 0.03 М NaOAc (pH 5.2) и выдерживали 4 ч при 37°C, прогревали 2 мин при 100°C и анализировали методом ОФХ; б) 0.5 OE_{260} олигонуклеотида выдерживали с нуклеазой P1 как описано выше, затем добавляли 1–2 мкл 1% NaOH до pH 8.5, 0.1 мг щелочной фосфатазы и выдерживали 4 ч при 37°C,

прогревали 2 мин при 100°C и анализировали методом ОФХ.

Олигорибонуклеотиды, содержащие *n*-азидотетрафторбензамидную группу в гетероциклическом основании (XIa)–(XIe) ([16]). К раствору 2–5 OE_{260} аминоксодержащего олигонуклеотида в 20 мкл смеси воды и DMF (1 : 1) (pH 9) через каждые 30 мин добавляли порциями по 10, 5 и 5 мкл раствор *N*-оксисукцинимидного эфира *n*-азидотетрафторбензойной кислоты (1.8 мг, 6 мкмоль) в 20 мкл DMF. Через 30 мин после последнего добавления реагента к реакционной смеси добавляли 2% раствор LiClO_4 в ацетоне, осадок центрифугировали и промывали ацетоном. Продукт выделяли обратенно-фазовой ВЭЖХ. Гомогенность выделенных модифицированных олигонуклеотидов 92–97% (ОФХ). Выходы и характеристики олигорибонуклеотидов (XIa)–(XIe), содержащих *n*-азидотетрафторбензамидную группу в гетероциклическом основании, приведены в табл. 3.

Работа выполнялась при поддержке РФФИ (грант № 96-04-50189) и гранта Министерства образования РФ “Фундаментальные исследования в области химических технологий”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Репкова М.Н., Иванова Т.М., Мещанинова М.И., Венямина А.Г. // Биоорганич. химия. 1998. Т. 24. С. 471–473.
2. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton; Ann Arbor; London; Tokyo: CRC Press, 1994.
3. Sylvers L.A., Wower J. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 411–419.
4. Шефлян Г.Я., Кубарева Е.А., Громова Е.С. // Успехи химии. 1996. Т. 65. С. 765–781.
5. Добриков М.И., Зарытова В.Ф., Комарова Н.И., Левина А.С., Лохов С.Г., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. С. 540–549.
6. Levina A.S., Berezovsky M.V., Venyaminova A.G., Repkova M.N., Zarytova V.F. // Biochimie. 1993. V. 75. P. 25–27.
7. Levina A.S., Tabatadze D.R., Dobrikov M.I., Shishkin G.V., Khalinskaya L.M., Zarytova V.F. // Antisense Nucl. Acids Drug Dev. 1996. V. 6. P. 119–132.
8. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Власов В.В. // Докл. РАН. 1996. Т. 351. С. 687–691.
9. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Лукьянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 553–560.
10. Табатадзе Д.Р., Третьякова Л.В., Левина А.С., Пышный Д.В., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 642–647.
11. Коваль В.В., Максакова Г.А., Федорова О.С. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 266–272.
12. Кобец Н.Д., Горожанкин А.В., Годовикова Т.С., Сильников В.Н., Кнорре Д.Г. // Докл. РАН. 1996. Т. 349. С. 822–825.

13. Lavrik O.I., Nashener H.-P., Weisshart K., Wold M.S., Prasad R., Beard W.A., Wilson S.H., Favre A. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 602–607.
14. Малыгин А.А., Васенева О.Г., Веньямина А.Г., Репкова М.Н., Карпова Г.Г. // Молекулярн. биология. 1998. Т. 32. С. 452–459.
15. Venyaminova A.G., Repkova M.N., Ivanova T.M., Dobrikov M.I., Bulygin K.N., Graifer D.M., Karpova G.G., Zarytova V.F. // Nucleosides Nucleotides. 1995. V. 14. P. 1069–1072.
16. Репкова М.Н., Иванова Т.М., Филиппов Р.В., Веньямина А.Г. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 432–440.
17. Repkova M.N., Venyaminova A.G., Zarytova V.F. // Nucleosides Nucleotides. 1997. V. 16. P. 1797–1798.
18. Bulygin K.N., Graifer D.M., Repkova M.N., Smolenskaya I.A., Venyaminova A.G., Karpova G.G. // RNA. 1997. V. 3. P. 1480–1485.
19. Смоленская И.А., Бulyгин К.Н., Грайфер Д.М., Иванов А.В., Веньямина А.Г., Репкова М.Н., Карпова Г.Г. // Молекулярн. биология. 1998. Т. 32. С. 233–241.
20. MacMillan M., Verdine G.L. // Tetrahedron. 1991. V. 47. P. 2603–2616.
21. Allerson C.R., Chen S.L., Verdine G.L. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 7423–7433.
22. Ferrer E., Fàbrega C., Garsia R.G., Azorín F., Eritja R. // Nucleosides Nucleotides. 1996. V. 15. P. 907–921.
23. Ferrer E., Wiersma M., Kazmierczak B., Moller C.W., Eritja R. // Bioconjugate Chem. 1997. V. 8. P. 757–761.
24. Liu J., Verdine G.L. // Tetrahedron Lett. 1992. V. 33. P. 4265–4268.
25. Talbot S.J., Goodman S., Bates S.R.E., Fishwick C.W.G., Stockley P.G. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 3521–3528.
26. Shah K., Wu H., Rana T.M. // Bioconjugate Chem. 1994. V. 5. P. 508–512.
27. Веньямина А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 941–950.
28. Markiewicz W.T., Biala E., Kierzek R. // Bull. Pol. Acad. Sci. Chem. 1984. V. 32. P. 433–451.
29. Веньямина А.Г., Комарова Н.И., Левина А.С., Репкова М.Н. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 484–489.
30. Usman N., Cedergren R. // Trends Biochem. Sci. 1992. V. 17. P. 334–339.
31. Anschutz R., Emery W.O. // Ann. 1887. V. 239. P. 301–313.
32. Добриков М.И., Приходько Т.А., Сафронов И.В., Шишкин Г.В. // Сиб. хим. журн. 1992. Вып. 2. С. 18–24.
33. Borer P.N. // Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. V. 1 / Ed. G.D. Fasman. Cleveland: CRC Press, 1975. P. 589.
34. Wlassoff W.A., Dobrikov M.I., Safronov I.V., Dudko R.Y., Bogachev V.S., Kandaurova V.V., Shishkin G.V., Dymshits G.M., Lavrik O.I. // Bioconjugate Chem. 1995. V. 6. P. 352–360.
35. Fukuhara T.K., Visser D.W. // J. Biol. Chem. 1951. V. 190. P. 95–98.
36. Roberts M., Visser D. W. // J. Am. Chem. Soc. 1952. V. 74. P. 668–669.
37. Sarfati S.R., Pochet S., Guerreiro C., Namane A., Huynh-Dinh T., Igolen J. // Tetrahedron. 1987. V. 43. P. 3491–3497.
38. Ikehara M., Kaneko M. // Tetrahedron. 1970. V. 26. P. 4251–4259.
39. Holmes R.E., Robins R.K. // J. Am. Chem. Soc. 1965. V. 87. P. 1772–1776.
40. Long R.A., Robins B.K. // Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry. V. 1 / Eds W.W. Zorbach, R.S. Tipson. New York; London; Sydney; Toronto: Intersci. Publishers, 1968. P. 228–229.

H-Phosphonate Synthesis of Oligoribonucleotides Containing Modified Bases.

I. Photoactivatable Derivatives of Oligoribonucleotides with Perfluoroarylazide Groups in Heterocyclic Bases

M. N. Repkova*, T. M. Ivanova*, N. I. Komarova*, M. I. Meshchaninova**,
M. A. Kuznetsova**, and A.G. Venyaminova**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Acad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

H-phosphonate synthesis was proposed for oligoribonucleotides containing a bromine atom or an ethylenediamine linker at positions C5 or C8 of uridine or adenosine, respectively. Novel photoactivatable derivatives of oligoribonucleotides harboring a *p*-azidotetrafluorobenzoyl group attached to uridine or adenosine through the diamino linker were synthesized.

Key words: adenosine C8-modified; amino linker; H-phosphonate method; photoactive oligoribonucleotides; uridine C5-modified

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (383-2) 396275, fax: +7 (383-2) 333677,
e-mail: ven@niboch.nsc.ru.