



УДК 577.113.6

ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ МЕЖНУКЛЕОТИДНУЮ ФОСФАМИДНУЮ СВЯЗЬ

© 2003 г. А. Н. Синяков*, А. С. Буторин**,
Д. С. Новопашина***, Л. Альби**, В. А. Рябинин**

* Институт молекулярной биологии ГНЦ ВБ "Вектор", 630559, пос. Кольцово Новосибирской обл.;

** Лаборатория биофизики, Национальный музей естественной истории, Париж, Франция;

*** Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск

Поступило в редакцию 24.06.2002 г. Принято к печати 24.09.2002 г.

Предложен метод функционализации олигонуклеотидов путем присоединения аминоклипронизводных по межнуклеотидному атому фосфора N3'-P5'-фосфамидной связи олигонуклеотида в присутствии трифенилфосфина, 4-диметиламинопиридина и 2,2'-дипиридилдисульфида. Реакция протекает как с низкомолекулярными алкиламинами (1,6-диаминогексан, *N,N*-диметил-1,3-диаминопропан), так и с лигандом малой бороздки, содержащим линкерную аминоклильную группу.

Ключевые слова: модифицированные олигонуклеотиды; лиганд малой бороздки; фосфамид.

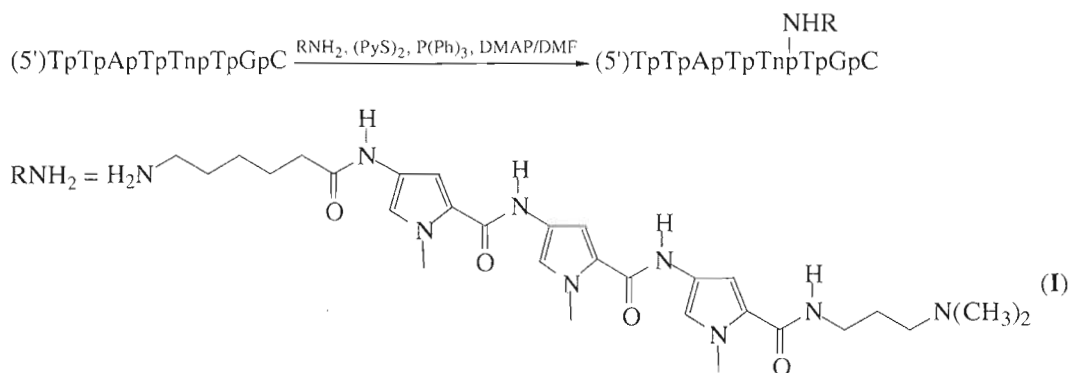
В настоящее время существуют самые разнообразные методы синтеза модифицированных олигонуклеотидов. Эти методы включают введение модифицирующих фрагментов как в процессе синтеза олигонуклеотидов с использованием модифицированных мономеров [1, 2], так и путем постсинтетической обработки олигонуклеотидов (см., например, [3]). Разработанные методики позволяют получать олигонуклеотиды и с модифицированными основаниями, и с модифицированным рибозофосфатным остовом. Один из наиболее распространенных способов введения модифицирующей группы по концевым 3'- и 5'-положениям олигонуклеотида предложен авторами работы [4] и в дальнейшем развитый в работах [5, 6]. Суть его заключается в обработке 3'-или (и) 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов первичными или вторичными алифатическими аминами в присутствии 2,2'-дипиридилдисульфида, трифенилфосфина и нуклеофильных катализаторов (*N*-метилимидазол, DMAР и т.д.), что приводит к образованию олигонуклеотидов с заместителями, присоединенными по концевым фосфатным группам через фосфамидную связь. При этом присоединения лиганда по межнуклеотидному атому фосфора не происходит. Недавно было показано, что в апротонных полярных растворителях (DMSO, DMF), кроме монофосфамида, происходит образование и бисфосфамида [7–9]. Это дает основания предполагать, что образо-

вание бисфосфамида возможно и при наличии межнуклеотидной фосфамидной связи в олигонуклеотиде, что позволит получать олигонуклеотиды с модифицированным фосфатным остовом. Поскольку в этих условиях межнуклеотидная фосфатная группа в реакцию не вступает, то заместитель будет вводиться в состав олигонуклеотида в положение, определяемое местонахождением фосфамидной связи.

Для определения возможности модификации олигонуклеотидов, включающих межнуклеотидную фосфамидную связь (пр), нами был использован олигодезоксирибонуклеотид (5')TrTrArTrTprTrGrC с N3'-P5'-фосфамидной связью, полученный по методике [10]. В качестве модифицирующих соединений (RNH₂) мы применяли низкомолекулярные алкиламины (1,6-диаминогексан, *N,N*-диметил-1,3-диаминопропан), а также малобороздочный лиганд (**I**) [11], содержащий на *N*-конце трипирролкарбоксамид алифатическую аминогруппу (остаток ε-аминокапроновой кислоты). Выбранный нами лиганд (**I**) позволяет контролировать присоединение его к олигонуклеотиду как хроматографически, так и по электронным спектрам. Олигонуклеотид (цетилдиметиламмониевая соль) выдерживали в течение 16 ч при комнатной температуре в DMF в присутствии трифенилфосфина, 2,2'-дипиридилдисульфида и 4-диметиламинопиридина и лиганда (**I**) в соответствии с методикой, приведенной в статье [3], и анализировали денатурирующим гель-электрофорезом (данные не приводятся) и офВЭЖХ (рис. 1).

Сокращения: DMAР – 4-диметиламинопиридин; (PyS)₂ – 2,2'-дипиридилдисульфид.

Автор для переписки (тел.: (3832) 30-46-53; эл. почта: ryabinin@niboch.nsc.ru).



Материал первого пика на хроматограмме реакционной смеси не содержит в своем составе олигонуклеотидного фрагмента и при гель-электрофорезе не наблюдается. Второй пик по времени удерживания, электрофоретической подвижности и электронному спектру отвечает исходному олигонуклеотиду. Третий пик соответствует продукту присоединения малобороздочного лиганда к олигонуклеотиду. Большее время удерживания обусловлено липофильными свойствами конъюгированного лиганда.

По данным электронной спектроскопии (рис. 2), продукт, отвечающий пику 3 на хроматограмме (рис. 1), действительно является конъюгатом олигонуклеотида и малобороздочного лиганда (I), так как его спектр представляет собой суперпозицию спектров олигонуклеотида и малобороздочного лиганда. Молекулярная масса выделенного конъюгата по данным масс-спектромет-

рии (MALDI-TOF, прибор Voyager de Pro (Perkin-Elmer Biosystems)) равна 2952.62, что соответствует расчетному значению для конъюгата лиганда (I) и модельного олигонуклеотида (2953.30).

Следует отметить, что реакция конъюгирования протекает не очень эффективно и выход продукта составляет 10–20%. Простое увеличение продолжительности выдерживания реакционной смеси приводит лишь к небольшому повышению выхода конъюгата. Использование в аналогичной реакции вместо лиганда (I) низкомолекулярного первичного амина – гексаметилендиамина или *N,N*-диметил-1,3-диаминопропана – также приводит к его присоединению к атому фосфора межнуклеотидной фосфамидной связи олигонуклеотида (5')TrTrArTrTnpTrGrC. По данным оф-ВЭЖХ и гель-электрофореза, выход целевого продукта в этом случае также невысок и составляет 10–20% (данные не приводятся). Следует подчеркнуть, что наблюдаемые превращения обусловлены наличием фосфамидной связи, так как олигонуклеотид (5')TrTrArTrTnpTrGrC, не содержащий фосфамидной связи, в аналогичных условиях не образует конъюгата с лигандом (I).

Предложенный метод функционализации олигонуклеотидов позволяет вводить заместитель, содержащий аминоалкильные остатки, по межнуклеотидной фосфатной группе. Место присоединения модифицирующего фрагмента определяется при этом положением фосфамидной связи,

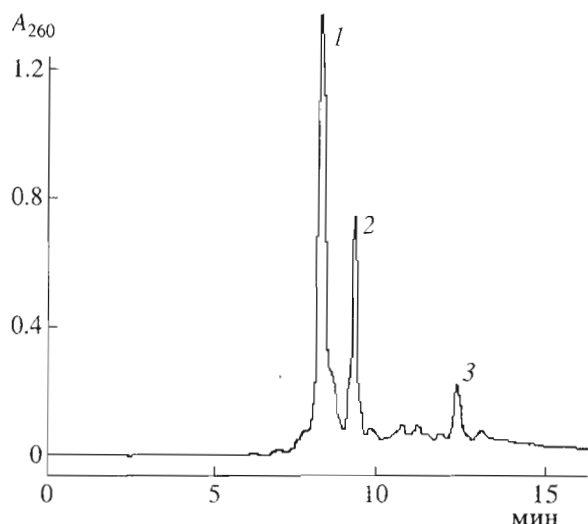


Рис. 1. Обращенно-фазовая хроматограмма реакционной смеси, получающейся при взаимодействии (5')TrTrArTrTnpTrGrC с лигандом (I). Линейный градиент ацетонитрила (5–40%) в 0.02 М ацетате аммония в течение 30 мин; скорость элюции 2 мл/мин. Хроматограф 1100 Agilent Technologies, колонка Waters C-18 X-Terra, 7.8 × 300 мм, 7 μ.

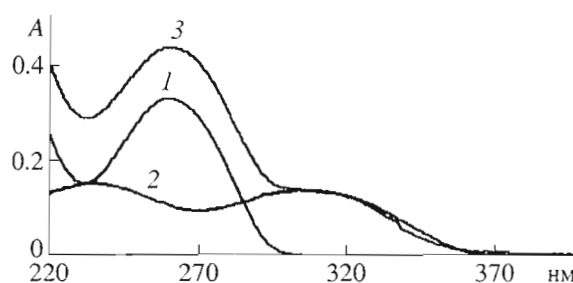


Рис. 2. Электронные спектры исходного олигонуклеотида (5')TrTrArTrTnpTrGrC (1), лиганда (I) (2) и их конъюгата (пик 3 на хроматограмме рис. 1) (3).

вводимой в олигонуклеотидную последовательность в процессе синтеза. Выход целевого продукта, хотя и не столь высок по сравнению с аналогичной модификацией концевой фосфатной группы (так, присоединение двух остатков малобороздочных лигандов протекает с выходом до 50% [7, 8]), вероятно, может быть увеличен за счет подбора условий реакции. Очевидно, что аналогичные превращения будут протекать с олигонуклеотидами, содержащими не только N3'-P5'-, но и N5'-P3'-фосфамидную связь, и предложенный метод может быть полезен для постсинтетического введения самых различных модифицирующих фрагментов в состав рибозофосфатного остова олигонуклеотида.

Работа выполнена при финансовой поддержке INTAS (проект № 01-0638), Министерства иностранных дел Франции (проект EGIDE 04542ND) и Международного проекта "Конъюгаты модифицированных олигонуклеотидов с лигандами малой бороздки, интеркаляторами и ингибиторами топоизомеразы – стабилизация тройной спирали и направленная модификация двуспиральной ДНК" (проект № 04.70043-69). Авторы благодарны Ж.-П. Бруару и Л. Дюбосту за регистрацию масс-спектров MALDI-TOF.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Methods in Molecular Biology: Protocols for Oligonucleotides and Analogs. Synthesis and Properties* / Ed. S. Agrawal. Totowa NJ: Humana Press, 1993. P. 143–390.
2. Verma S., Eckstein F. // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 99–134.
3. Grimm G.N., Boutorine A.S., Helene C. // *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids.* 2000. V. 19. P. 1943–1965.
4. Hashimoto M., Ueki M., Mukaiyama T. // *Chem. Lett.* 1976. V. 2. P. 157–160.
5. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Мальцева Т.В., Халимская Л.М. // *Биоорган. химия.* 1989. Т. 15. С. 1246–1252.
6. Knorre D.G., Alekseyev P.V., Gerassimova Y.V., Silnikov V.N., Maksakova G.A., Godovikova T.S. // *Nucleosides Nucleotides.* 1998. V. 17. P. 397–410.
7. Рябинин В.А., Денисов А.Ю., Пышный Д.В., Абрамова Т.В., Сinyaков А.Н., Власов В.В. // *Докл. АН.* 1999. Т. 368. С. 836–838.
8. Денисов А.Ю., Рябинин В.А., Пышный Д.В., Абрамова Т.В., Сinyaков А.Н. // *Журн. структ. химии.* 2001. Т. 42. С. 11–119.
9. Kostenko E., Dobrikov M., Pyshnyi D., Petyuk V., Komarova N., Vlassov V., Zenkova M. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. P. 3611–3620.
10. Baraniak J., Korczynsky D., Kaczmarek R., Wasilewska E. // *Nucleosides Nucleotides.* 1998. V. 17. P. 1347–1353.
11. Рябинин В.А., Сinyaков А.Н. // *Биоорган. химия.* 1998. Т. 24. С. 601–607.

Functionalization of the Oligonucleotides Containing an Internucleotide Phosphoramidate Bond

A. N. Sinyakov*, A. S. Boutorine**, D. S. Novopashina***, L. Halby**, and V. A. Ryabinin**

Phone: +7 (3832) 30-4653, e-mail: ryabinin@niboch.nsc.ru

*Institute of Molecular Biology, Vector State Research Center of Virology and Biotechnology, pos. Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 630559 Russia

**Laboratoire de Biophysique, INSERM U565–CNRS UMR 8646,

Muséum National d'Histoire Naturelle, 43 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France

***Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

A new method for functionalization of oligonucleotides by addition of aminoalkyl derivatives to the intermolecular phosphorus atom of the oligonucleotide N3'-P5' phosphoramidate bond in the presence of triphenylphosphine, 4-dimethylaminopyridine, and 2,2'-dipyridyl disulfide was suggested. The reaction proceeded with both low-molecular alkylamines (1,6-diaminohexane or *N,N*-dimethyl-1,3-diaminopropane) and a ligand in minor groove containing a aminoalkyl group. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: minor groove ligand, modified oligonucleotides, phosphoramidate