



УДК 547.963.32.04

ПОЛУЧЕНИЕ АЛКИЛИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ
ЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С poly(A)

*Зарытова В. Ф., Карпова Г. Г., Пичко Н. П.,
Шешегова Е. А.*

*Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР*

Введением 2'3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)]бензилиденового остатка в $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{URCl}$ получено алкилирующее производное $(\text{Ph}(\text{NH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{URCl}$ в виде смеси диастереомеров. Показано, что этот реагент образует с poly(A) комплементарные комплексы. По изотерме адсорбции при 0° С оценена кажущаяся константа связывания. При алкилировании poly(A) в комплексе с $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{URCl}$, протекающем с высокой эффективностью, образуются 3-, 7- и 1-RAde. Их количество в условиях максимально достигаемой концентрации реагента составляет соответственно 13, 4 и 3 на 10000 нуклеотидных звеньев poly(A).

Ранее было показано, что алкилирующие производные олигонуклеотидов, даже таких коротких, как тринуклеотиды, являются эффективными реагентами, которые с высокой избирательностью модифицируют отдельные основания нуклеиновых кислот [1–3]. Это открывает возможность использования их для специфических воздействий на клетки и живые организмы. Однако такие алкилирующие производные олигонуклеотидов могут быть введены в клетку только с помощью липосом [4], и, скорее всего, будут подвергаться действию клеточных нуклеаз, что приведет к разрушению адресующей части реагента и потере специфичности.

Превращение межнуклеотидных фосфодиэфирных групп в триэфирные путем этерификации этиловым спиртом не приводит к потере способности олигонуклеотидов к комплементарным взаимодействиям [5, 6]. В то же время такие производные становятся достаточно гидрофобными для прохождения через мембраны и приобретают устойчивость к нуклеазам [7].

Целью настоящей работы является получение этилового эфира олигонуклеотида, несущего алкилирующую группировку, $(\text{PhNH})_2\text{p} \cdot [\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{URCl}$, и исследование его взаимодействия с poly(A).

Способ введения этильного остатка по межнуклеотидным фосфатным группам в значительной степени определяется методом синтеза исходного

Использованы обозначения, рекомендованные номенклатурой IUPAC-IUB, но символ d для обозначения олиготимидилатов опущен. Другие сокращения: TPS — тризопропилбензолсульфохлорид, $(\text{Ar})_3\text{ARCl}$, URCl и $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{URCl}$ — 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)]бензилиденовые производные гексаденилата, уридина и тетраэтилового эфира 5'-дианилида пентауклеотида; RAde — 2-(N-метил-N-4-формилфениламино)этиладевин; RCl — 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензальдегид.

олигонуклеотида. При синтезе олигонуклеотида диэфирным методом алкильный остаток может быть введен с помощью конденсирующего реагента [5, 8], в случае синтеза триэфирным методом *n*-хлорфенильный остаток может быть заменен на этильный в присутствии катализатора CsF [9–11].

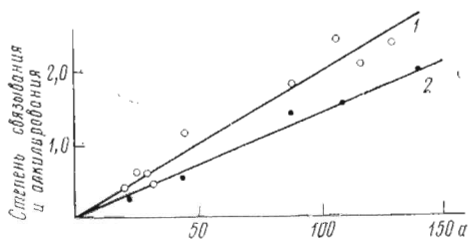
Мы использовали диэфирный метод синтеза пентануклеотида $((\text{PhNH})_2\text{p}(\text{Tr})_4\text{U}(\text{Ac})_2)$ из тетрануклеотида $(\text{PhNH})_2\text{p}(\text{Tr})_3\text{T}$ и предварительно активированного с помощью TPS ацетата $\text{pU}(\text{Ac})_2$. Дезацетилированный в ходе хроматографического выделения пентануклеотид $(\text{PhNH})_2\text{p}(\text{Tr})_4\text{U}_2$ ацетилировали уксусным ангидридом [12]. Полученный пентануклеотид $(\text{PhNH})_2\text{p}(\text{Tr})_4\text{U}(\text{Ac})_2$ обработкой этанолом в присутствии мезитилсульфотетразолида при 50° С переводили в триэфирное производное $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{U}(\text{Ac})_2$. Для удаления ацетильных групп его выдерживали с аммиаком в течение 24 ч. Длину и состав полученного олигонуклеотида на этой стадии не оценивали, поскольку полностью удалить этильные остатки у $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{U}$ без разрыва межнуклеотидных связей затруднительно. Такая оценка была сделана по соотношению олигонуклеотидного материала и радиоактивной метки после введения в пентануклеотид по *cis*-диольной группировке алкилирующего остатка бензальдегида $[^{14}\text{C}]\text{RCl}$ в безводном диметилформамиде в присутствии 2,2-диметоксипропана и трифторуксусной кислоты [13, 14]. При хроматографии полученного продукта на бумаге в системе А от основной массы УФ-поглощающего материала отделяется небольшая фракция, содержащая непрореагировавший $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{U}$. Полученный алкилирующий олигонуклеотид $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{U}[^{14}\text{C}]\text{RCl}$ в условиях, типичных для гидролиза бензилиденевой связи (рН 2; 20° С; 2 ч), гидролизуетя до исходных пентануклеотида $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{U}$ и бензальдегида $[^{14}\text{C}]\text{RCl}$. Последний регистрировали по появлению УФ-поглощения при 350 нм [15, 16].

Полагая, что алкилирующий пентануклеотид содержит один остаток $[^{14}\text{C}]\text{RCl}$, с учетом величины радиоактивности в расчете на 1 OE_{260} была определена молярная экстинкция $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{U}[^{14}\text{C}]\text{RCl}$, составляющая $63 \cdot 10^3$. Вычитанием из этой величины молярной экстинкции RCl -фрагмента для $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{U}$ получена $E_{260}^{\text{pH}7}$ $44,5 \cdot 10^3$, что соответствует литературным данным [17]. С использованием этих величин найдено, что содержание $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{URCl}$ в препарате, получаемом из реакционной смеси после осаждения эфиrom, составляет 92%. Этот продукт в дальнейших экспериментах непосредственно использовался без хроматографической очистки. Следует отметить, что растворимость реагента в воде низкая — порядка 40 мкМ.

Пентануклеотид $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{URCl}$ представляет собой сложную смесь диастереомеров из-за наличия в нем четырех асимметрических атомов фосфора и асимметрических атомов углерода в рибозе и RCl -фрагменте.

Способность реагента $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{URCl}$ к комплементарно адресованному алкилированию мы исследовали на примере его взаимодействия с $\text{poly}(\text{A})$. Комплексообразование изучали при 0° С при концентрации нуклеотидного материала 0,17 мМ. В этих условиях реагент образует с $\text{poly}(\text{A})$ комплементарные комплексы в довольно низкой концентрации (см. рисунок). При концентрации реагента 22 мкМ около 2–3 моль его связывается с 10^3 моль нуклеотидов $\text{poly}(\text{A})$. Кажущаяся константа ассоциации реагента с $\text{poly}(\text{A})$, определенная по данным равновесного диализа, составляет $2,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.

При выдерживании $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{URCl}$, взятого в различных концентрациях, с 0,17 мМ $\text{poly}(\text{A})$ при 5° С в течение 36 сут (два периода полупревращения RCl -фрагмента в промежуточный этилениммониевый катион [18]) наблюдается ковалентное присоединение реагента к $\text{poly}(\text{A})$. Из данных работ [6, 11] следует, что этиловые эфиры дезоксирибоолиго-



Зависимость степени связывания (1) и алкилирования (2) в моль реагента на 10^3 моль нуклеотидов poly(A) от соотношения $a = [\text{реагент}]_0 / [10^3 \text{ нуклеотидов poly(A)}]_0$ в исходной смеси

нуклеотидов в этих условиях стабильны. После отделения полимера от не вступившего в реакцию реагента гель-фильтрацией при 45°C по радиоактивности фракции легко определяется степень модификации, которая изменяется пропорционально концентрации реагента (рисунок).

Эффективность алкилирования poly(A) может быть охарактеризована отношением доли реагента p , пошедшей на реакцию с poly(A), к доле реагента s , пошедшей на побочные превращения этилениммониевого катиона, при концентрации нуклеотидных остатков 1 М. При прямом взаимодействии реагента с РНК величина p/s имеет порядок 10 M^{-1} [19]. При алкилировании в комплексе она повышается на несколько порядков [19]. В рассматриваемом случае отношение p/s составляет $2,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, что свидетельствует о протекании реакции в комплементарном комплексе, концентрация которого не превышает нескольких процентов от концентрации реагента. Повышение температуры алкилирования до 20°C приводит к практически полному разрушению комплексов poly(A) с $(\text{PhNH})_2\text{p} \cdot [\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{URCl}$.

Для идентификации модифицированных в комплексе остатков аденина в алкилированной poly(A) при pH 4 и 40°C удаляли бензилиденные группы, затем гидролизовали 0,6 н. щелочью при 37°C . Образующиеся вещества, содержащие радиоактивную метку, идентифицировали после гидролиза гликозидной связи в 1 н. HCl при 100°C . Из смеси алкилированных аденинов в системе В выделены вещества (I), (II) и (III), гомогенные в трех системах растворителей (таблица). На основании совпадения их хроматографической подвижности с подвижностью ранее охарактеризованных продуктов алкилирования ДНК селезенки быка с помощью $(\text{Ar})_5\text{ARCl}$ [20] и аденозина с помощью URCl [21] вещества (I), (II), (III) отнесены к продуктам гидролитического расщепления имидазольного цикла 7-RAde, 3-RAde и N^6 -RAde соответственно (таблица). Другие вещества в гидролизате практически отсутствовали.

Полученные данные позволяют заключить, что основными продуктами модификации poly(A) в комплементарном комплексе с $(\text{PhNH})_2\text{p} \cdot [\text{Tr}(\text{Et})]_4\text{URCl}$ являются 3-RAde (64%), 7-RAde (22%), который в условиях щелочного гидролиза в 0,6 н. NaOH и, возможно, в условиях алкилирования по аналогии с работой [20] полностью расщепляет имидазольный цикл, и 1-RAde (14%), претерпевающий в щелочи перегруппировку Димрота [21] с образованием N^6 -RAde.

Количество 3-, 7- и 1-RAde в условиях максимально достигаемой концентрации реагента в среднем составляет соответственно 13, 4 и 3 на 10000 нуклеотидных звеньев poly(A).

Образование трех изомерных аденинов — обычное явление при алкилировании нуклеиновых кислот в растворе. Однако в случае модификации в комплексе это может указывать как на образование нескольких конформаций комплексов, так и на отсутствие в них жесткой конформации модифицирующей группы реагента.

Экспериментальная часть

В работе использовали мезитиленсульфотетразолид [23] и TPS [24], полученные по описанным методикам.

Состав и хроматографическая подвижность алкилированных аденинов, полученных из poly(A), модифицированной (PhNH)₂p[Tr(Et)]₄URCl, при 5° С

Вещества	R _f в системах				R ₃ -RAde в системе В*	Содержание, %
	В	Г	Д	Е		
(I)	0,22	0,68	0,84	0,37	0,70	22
(II)	0,32	0,79	0,80	0,53	1,00	64
(III)	0,58	0,77	0,85	0,87	1,8	14
3-RAde [20]	0,27	0,79	0,81		1,0	
N ⁶ -RAde [21]		0,75	0,88	0,86		
1-RAde [21]		0,61	0,74	0,72		
N ⁶ -Формил-N ⁵ -[β-(N-4-формилфенил-N-метиламино)этил]-4,5,6-триамино-пиримидин [20]	0,20	0,70	0,85		0,74	
3-MeAde *	0,39				1,00	
1-MeAde *	0,24				0,62	
7-MeAde *	0,30				0,77	
N ⁵ -Метил-N ⁵ -формил-4,5,6-триамино-пиримидин *	0,30				0,77	
N ⁶ -MeAde *	0,66				1,7	

* Из работы [22].

Poly(A) (производство СКТБ БАВ, Новосибирск) очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-100 (Pharmacia, Швеция) и собирали узкую зону высокополимерного материала. Экстинкцию при 260 нм одного нуклеотида poly(A) ($11,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$) рассчитывали на основании поглощения растворов poly(A) до и после щелочного гидролиза (0,6 н. NaOH, 37° С, 24 ч). Концентрацию poly(A) выражали в миллимолярной концентрации нуклеотидов или в молях полимера длиной в 1000 нуклеотидов.

Радиоактивность растворов просчитывали в диоксановом сцинтиляторе, радиоактивность на бумаге — в толуольном, используя счетчик Mark-II (Nuclear Chicago, США).

Для хроматографии на бумаге FN-1 (Filtrak, ГДР) применяли следующие системы растворителей: *n*-пропанол — аммиак — вода, 55 : 10 : 35 (А); этанол — 1 М ацетат аммония (рН 7,5), 7 : 3 (Б); бутанол — вода — этанол, 80 : 25 : 10 (В); изопропанол — конц. HCl — вода, 170 : 41 : 39 (Г); изопропанол — вода, 6 : 4 (Д); *трет*-бутанол — метилэтилкетон — HCOOH — H₂O, 40 : 30 : 15 : 15 (Е); для тонкослойной хроматографии на пластинках с силифолом применяли системы растворителей: хлороформ — этанол, 9 : 1 (Ж) и хлороформ — метанол — триэтиламин, 7,5 : 2,4 : 0,1 (И).

(C₈H₅NH)₂p(Tr)₄ был получен диазфирным методом путем последовательного присоединения рTrТ(Ас) и рТ(Ас), предварительно активированных с помощью полистиролсульфохлорида, к (C₈H₅NH)₂pГ.

(PhNH)₂p(Tr)₄U. Высушили азеотропно с пиридином 50 мкмоль рU(Ас)₂, к остатку добавили 0,15 мл пиридина и 150 мкмоль TPS. Через 30 мин реакционную смесь добавили к 10 мкмоль (PhNH)₂p(Tr)₃T, предварительно несколько раз упаренного с пиридином. За протеканием реакции следили по накоплению четырехзарядного вещества при анализе аликвоты реакционной смеси методом микроколоночной хроматографии в системе Томлинсона — Тенера. Через 24 ч к реакционной смеси при охлаждении до 4° С добавили 0,1 мл воды, выдержали 1 ч и хроматографировали на DEAE-молселекте А-25 (15 мл) в градиенте концентраций бикарбоната аммония от 0 до 1 М по 300 мл, собирая фракции по 3 мл. Фракции 85–97, содержащие необходимый продукт, упарили досуха, остаток растворили в 10 мл воды и нанесли на колонку (70 мл) с сефадексом G-15 для удаления остатков сульфокислоты, элюцию проводили водой. Фракции, содержащие пентануклеотид, объединили, упарили, получили 220 ОЕ₂₆₅ (PhNH)₂p(Tr)₄U, что составляет 50% на взятый тетра-нуклеотид.

R_{pT} 0,65 в системе Б, R_{pT} 1,2 в системе А, λ_{\max} 265 нм. Ацетилирование полученного пентануклеотида проводили уксусным ангидридом [12]. Для $(PhNH)_2p(Tp)_4U(Ac)_2$ R_{pT} 1,2 в системе Б. Выход 200 OE_{265} .

$(PhNH)_2p(Tp)_4U$. Многократно упарили с пиридином 5 мкмоль $(PhNH)_2p(Tp)_4U(Ac)_2$. Остаток растворили в 0,5 мл пиридина, добавили 50 мкмоль мезитилентетразолида и 70 мкмоль абс. этанола и полученную реакционную смесь выдерживали при 50° С. За ходом реакции следили методом ТСХ в системе Ж по накоплению соединения с R_f 0,73. Через 12 ч к реакционной смеси добавили 0,3 мл воды, выдержали 1 ч, упарили, удалили пиридин упариванием с водой. Остаток растворили в 1,5 мл хлороформа и хроматографировали на пластинках в системе Ж. Вещество с R_f 0,73 анализировали в двух системах. R_{pT} 2,7 в системе Б и R_f 0,82 в системе И. Для удаления ацетильных групп полученный $(PhNH)_2p(Tp)_4U(Ac)_2$ растворили в 1 мл пиридина, добавили 0,1 мл конц. аммиака и выдержали 24 ч при 20° С. Реакционную смесь упарили досуха, остаток упарили несколько раз с водой, растворили в 2 мл хлороформа, нанесли на бумагу FN-1 и хроматографировали в системе Б. Вещество с R_{pT} 2,4 элюировали хлороформом и анализировали хроматографией в системе Ж (R_f 0,7) и в системе И (R_f 0,73). Выход $(PhNH)_2p(Tp)_4U$ составил 60 OE_{265} .

$(PhNH)_2p(Tp)_4U[^{14}C]RCl$ (6 мКи/ммоль) получили, как описано в работах [13, 14], обрабатывая при -70° С раствор 0,7 мкмоль $(PhNH)_2p(Tp)_4U$ в 0,15 мл диметилформамида 70 мкмоль $[^{14}C]RCl$ в присутствии 150 мкмоль трифторуксусной кислоты и 75 мкмоль 2,2-диметоксипропана. После смешения реакционную смесь выдерживали 45 мин при комнатной температуре, нейтрализовали при -70° С триэтиламином и осаждали эфиром. Полученный продукт растворили в метаноле и осадили эфиром. Пересаживание повторили трижды. Выход 70%. Препарат охарактеризован хроматографической подвижностью на бумаге FN-1 и на пластинках с силуфолом: подвижность относительно $(PhNH)_2p(Tp)_4U$ 1,4; 1,24 и 1,35 в системах А, Ж и И соответственно. Молярную экстинкцию продукта при pH 7 определяли после хроматографии на бумаге в системе А по соотношению оптической плотности и радиоактивности основной УФ-поглощающей фракции, полагая, что продукт содержит один остаток $[^{14}C]RCl$. Из молярной экстинкции $(PhNH)_2p(Tp)_4URCl$ с учетом молярной экстинкции RCl-фрагмента [25] рассчитывали молярную экстинкцию $(PhNH)_2p(Tp)_4U$. Соотношение $(PhNH)_2p(Tp)_4U:RCl$ в препарате определяли спектрофотометрически после гидролиза бензилиденовой связи при pH 2 и 20° С, как в работах [15, 16].

Связывание $(PhNH)_2p(Tp)_4URCl$ с poly(A) проводили по методу равновесного диализа [26] при 0° С в 0,2 М NaCl, 0,01 М MgCl₂, 0,01 М трис-HCl, pH 7,4 (буфер 1). Концентрация poly(A) 0,17 мМ нуклеотидов, реагента - 1,3-21,6 мМ. Объем ячеек 0,25-0,5 мл. Для определения концентрации реагента в ячейках отбирали по 2 пробы объемом по 0,04 мл и просчитывали радиоактивность. Если poly(A) и реагент помещали в разные ячейки, то равновесие достигалось за 3 сут, если в одну ячейку - то через 2 сут. В обоих случаях концентрации олигомеров в ячейках достигали после установления равновесия одних и тех же значений. Равновесие считали установившимся, если концентрация олигомеров в ячейках не менялась в течение 20 ч. За время установления равновесия ~7% реагента превращалось в активную алкилирующую частицу [19]. Исходя из этой величины, с учетом эффективности алкилирования мы оценили, что не более 0,2% реагента расходовалось на алкилирование poly(A) при 0° С за 3 сут. За время установления равновесия до 30% реагента сорбировалось на мембране.

Степень ассоциации $(PhNH)_2p(Tp)_4URCl$ с poly(A) вычисляли по методу, описанному в работе [26], и выражали в молях реагента на 10³ моль нуклеотидных остатков poly(A). Кажущуюся усредненную коп-

станту ассоциации (K, M^{-1}) вычисляли так, как указано в работе [26]; максимальное число участков связывания на полимере (b) принимали равным 125 в расчете на 1000 нуклеотидных звеньев $poly(A)$, поскольку в комплементарном комплексе модифицируется третий нуклеотид от 5'-конца участка связывания по данным работ [1, 14]. Точность определения константы — не более 50%.

Алкилирование $poly(A)$ в комплексе с $(PhNH)_2p[Tr(Et)]_4URCl$ проводили в буфере 1 при 50° С в течение 36 сут в присутствии следов хлороформа. Согласно работе [18], за это время ~75% бензилиденовых производных олигонуклеотидов превращается в алкилирующую частицу. Концентрация $poly(A)$ 0,17 мМ нуклеотидов, реагента — 1,7–23,8 мкМ. Алкилированную $poly(A)$ отделяли от продуктов превращения реагента гель-фильтрацией реакционной смеси на колонке с сефадексом G-75 (40×1 см) в 0,01 М трис-НСl при 45° С. Скорость элюции 30 мл/ч. Объем фракций 0,5–0,8 мл. Во фракциях измеряли радиоактивность. В первом пике получали алкилированную $poly(A)$, во втором — продукты превращения реагента, не вступившего в реакцию с $poly(A)$. Степень модификации определяли по радиоактивности фракции $poly(A)$ и выражали в моль остатков реагента на 10^3 моль нуклеотидов $poly(A)$. Эффективность алкилирования вычисляли из зависимости степени модификации от концентрации реагента [19].

Алкилирование $poly(A)$ $(PhNH)_2p[Tr(Et)]_4URCl$ при 20 и 37° С проводили аналогично, выдерживая реакционные смеси 7 сут и 8 ч соответственно. За это время реагент полностью превращается в активную алкилирующую частицу [18].

Идентификация алкилированных оснований. После гидролиза бензилиденовой связи в радиоактивных заместителях (0,2 М ацетат натрия, 40° С, pH 3,8; 1 ч) алкилированную $poly(A)$ выдерживали 24 ч в 0,6 н. NaOH при 37° С, затем 1 ч в 1 н. HCl при 100° С. Продукты кислотного гидролиза обессоливали на биогеле Р-2 по методике, описанной в работе [27], и разделяли хроматографией на бумаге в системе В. Участки хроматограмм, соответствующие веществам с R_f 0,22; 0,32 и 0,58, после счета радиоактивности в толуольном сцинтилляторе промывали 4 раза эфиром и радиоактивный материал элюировали с них 3 мл 0,1 н. HCl в течение 12–15 ч. Элюаты упаривали досуха, следы HCl удаляли упариванием с водой (3–4 раза) и остаток растворили в 100 мкл 0,1 н. HCl. Индивидуальность полученных соединений доказывали хроматографией в системах Г, Д и Е. О строении алкилированных аденинов судили, сравнивая их подвижность с подвижностью ранее охарактеризованных соединений [20, 21] (таблица).

ЛИТЕРАТУРА

1. Grineva N. I., Karpova G. G., Kuznetsova L. M., Venkstern T. V., Bayev A. A. Complementary addressed modification of yeast tRNA₁^{Val} with alkylating derivative of d(pC-G)-A. The positions of the alkylated nucleotides and the cause of the alkylation in the complex. — Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, № 5, p. 1609–1631.
2. Гринева Н. И. Химическое алкилирование в специфических комплексах как метод исследования структуры и функций нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. — Биохимия, 1977, т. 42, вып. 2, с. 370–374.
3. Бенцмейская Л. З., Герасимова Л. М., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Комплементарно-адресованное алкилирование и фрагментация ДНК фага Т7 вблизи олиготимидиловых последовательностей. — Молекулярн. биология, 1978, т. 12, вып. 5, с. 988–1001.
4. Стефанович Л. Е., Лунде С. А., Карпова Г. Г., Гринева Н. И., Магарилл С. И. Использование липосом для введения алкилирующих производных моно- и олигонуклеотидов в клетки млекопитающих. — Биохимия, 1979, т. 44, вып. 7, с. 1289–1295.
5. Miller P. S., Barrett J. C., Ts'o P. O. P. Synthesis of oligodeoxyribonucleotide ethyl phosphotriesters and their specific complex formation with transfer ribonucleic acids. — Biochemistry, 1974, v. 13, № 24, p. 4887–4896.
6. Pless R. C., Ts'o P. O. P. Duplex formation of a nonionic oligo(deoxythymidylate)-analogue [heptadeoxythymidyl-(3'-5')-deoxythymidine heptaethyl ester (d)Tr-

- (Et)₃T] with poly(deoxyadenylate). Evaluation of the electrostatic interaction.—*Biochemistry*, 1977, v. 16, № 6, p. 1239–1250.
7. Miller P. S., Braiterman L. T., Ts'o P. O. P. Effect of a trinucleotide ethyl phosphotriester, G^mp(Et)G^mp(Et)U on mammalian cells in culture.—*Biochemistry*, 1977, v. 16, № 9, p. 1988–1996.
 8. Зарытова В. Ф., Шешегова Е. А. Исследование механизма химического синтеза олигонуклеотидов. XII. Взаимодействие фосфодиэфирных групп олигодезоксинуклеотидов со спиртами и аминами в присутствии конденсирующих агентов по данным ³¹P-ЯМР.—*Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 7, с. 901–909.
 9. Ogilvie K. K., Beaucage S. L., Theriault N., Entwistle D. W. A general transesterification method for the synthesis of mixed trialkyl phosphates.—*J. Amer. Chem. Soc.*, 1977, v. 99, № 4, p. 1277–1278.
 10. Ramirez F., Marecek J. F. Nucleophilic catalysis of phosphorylations by *p*-nitrophenyldiphenyl phosphate and by alkyl ethylene phosphates in aprotic solvents.—*Tetrahedron Lett.*, 1977, № 11, p. 967–970.
 11. Петренко В. А., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. Н. Неионные аналоги олигонуклеотидов. Синтез алкиловых триэфиров олигонуклеотидов реакцией перэстерификации.—*Биоорг. химия*, 1980, т. 6, № 3, с. 431–435.
 12. Kössel H., Moon M. W., Khorana H. G. Studies on polynucleotides. LX. The use of preformed dinucleotide blocks in stepwise synthesis of deoxyribopolynucleotides.—*J. Amer. Chem. Soc.*, 1967, v. 89, № 9, p. 2148–2154.
 13. Райт В. К., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. Конформация 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензилиден]олигодитидилатов и свойства их комплексов с полиинозиновой кислотой.—*Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 1, с. 31–38.
 14. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Кузнецова Л. М., Чимитова Т. А., Венкстерн Т. В., Шершневая Л. П., Бавв А. А. Комплементарно адресованное алкилирование тРНК^{Val} дрожжей хлорэтилметиламинобензилиденовым производным d(pC-G)-А. Доклад о модификации третьего нуклеотида от 5'-конца участка полностью связывания реагента.—*Молекуляр. биология*, 1976, т. 10, вып. 6, с. 1260–1271.
 15. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кюрре Д. Г. Алкилирующие производные компонент нуклеиновых кислот. VII. Метилловый эфир 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]уридин-5'-фосфата.—*Ж. общ. химии*, 1970, т. 40, вып. 1, с. 215–222.
 16. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кюрре Д. Г. Алкилирующие производные компонент нуклеиновых кислот. VIII. Превращение ацеталей 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензальдегида, производных пириимидиновых нуклеотидов и олигонуклеотидов.—*Изв. Сиб. отд. АН СССР*, 1970, № 4, сер. хим. наук, вып. 2, с. 111–118.
 17. Schwarz Bioresearch Radiochemical Catalog. New York: 1971, p. 51.
 18. Власов В. В., Гринева Н. И., Кюрре Д. Г. Алкилирующие производные компонент нуклеиновых кислот. VI. Ионизация 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензальдегида и его ацеталей.—*Изв. Сиб. отд. АН СССР*, 1969, № 2, сер. хим. наук, вып. 1, с. 104–109.
 19. Бенцмещкая Л. З., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П., Чимитова Т. А. О механизме алкилирования нуклеиновых кислот в комплексах. Кинетика алкилирования РНК и ДНК 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]олигонуклеотидами.—*Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 7, с. 909–913.
 20. Бенцмещкая Л. З., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. Алкилирующие основания, образующиеся при 5'-комплементарно адресованной модификации ДНК, и кинетика их элиминирования в условиях алкилирования.—*Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 10, с. 1372–1381.
 21. Беликова А. М., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Алкилирование нуклеиновых кислот и их компонентов. XI. Алкилирование нуклеозидов 2',3'-O-[4-(N-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]уридином.—*Изв. Сиб. отд. АН СССР*, 1972, № 9, сер. хим. наук, вып. 4, с. 101–109.
 22. Singer B., Fraenkel-Conrat H. Reaction of adenosine with ethylating agents.—*Biochemistry*, 1974, v. 13, № 9, p. 1913–1920.
 23. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A. Arylsulfonyltetrazoles as highly efficient condensing reagents for polynucleotide synthesis.—*Can. J. Chem.*, 1976, v. 54, № 4, p. 670–672.
 24. Lohrmann R., Khorana H. G. Studies on polynucleotides. LII. The use of 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride for the synthesis of internucleotide bonds.—*J. Amer. Chem. Soc.*, 1966, v. 88, № 4, p. 829–833.
 25. Беликова А. М., Гринева Н. И. Алкилирующие производные *n*-аминобензилиденуридина.—*Изв. Сиб. отд. АН СССР*, 1966, № 11, сер. хим. наук, вып. 3, с. 79–83.
 26. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П. Новый метод определения параметров комплексообразования олигонуклеотидов с нуклеиновыми кислотами по данным алкилирования в комплексах. Сравнение с методом равновесного диализа.—*Молекуляр. биология*, 1978, т. 12, вып. 1, с. 135–146.
 27. Узил М. Обессоливание нуклеотидов с помощью гель-фильтрации.—*В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот*. М.: Мир, 1970, с. 90–96.

Поступила в редакцию
13.III.1980

SYNTHESIS OF ALKYLATING DERIVATIVES OF OLIGONUCLEOTIDE ETHYL
ESTERS AND THEIR INTERACTION WITH POLY(A)

ZARYTOVA V. F., KARPOVA G. G., PICHKO N. P., SHESHEGOVA E. A.

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

Alkylating derivative - $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tp}(\text{Et})]_4\text{URCl}$ was obtained as a mixture of diastereomers by introducing the 2',3'-O-[4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)]-benzylidene fragment into $(\text{PhNH})_2[\text{Tp}(\text{Et})]_4\text{U}$. This alkylating reagent was shown to form the complementary complexes with poly(A). Apparent binding constant was evaluated from the plot of binding at 0° C obtained by equilibrium dialysis. Alkylation of poly(A) with $(\text{PhNH})_2\text{p}[\text{Tp}(\text{Et})]_4\text{URCl}$ in the complex was highly effective and gave 3-, 7- and 1-RAde. Their amounts at maximal attainable concentration of the reagent were about 13, 4 and 3, respectively per 10 000 of nucleotide units in poly(A).
