



УДК 547.963.32.07:577.113.4

СИНТЕЗ ТРИЭФИРНЫХ АНАЛОГОВ ДИ(ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИД) ФОСФАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОСТАТОК ГИДРОКСИЛАМИНА

Петренко В. А., Поздняков П. П.

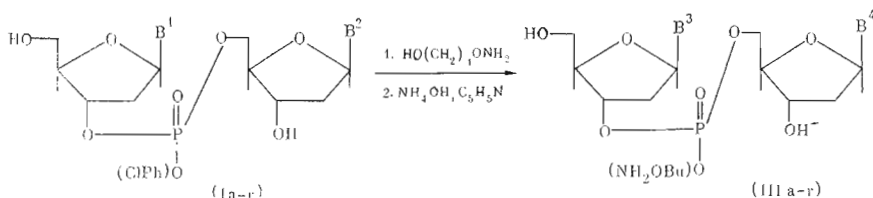
*Всесоюзный научно-исследовательский институт
молекулярной биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Получены 4-аминоксibuтиловые эфиры ди(дезоксинуклеозид) фосфатов d[Tr(NH₂OBu)T], d[Tr(NH₂OBu)C], d[Ar(NH₂OBu)T] и d[Gp(NH₂OBu)T]. Ключевой стадией синтеза явилась перэтерификация хлорфениловых эфиров в защищенных производных ди(дезоксинуклеозид) фосфатов в присутствии CsF и 4-аминоксibuтанола-1. Последний получен из тетрагидрофурана с выходом 50%. С помощью ТСХ и УФ-спектроскопии показано, что в условиях алкоголиза (1 ч, 20° С) не происходит взаимодействия аминоксигруппы с нуклеозидными остатками ди(дезоксинуклеозид) фосфатов. Целевые соединения выделены обращенно-фазовой хроматографией с выходом 30–60%. Их строение доказано реакциями с хлористым шкрифлом, реактивом Динше, ацетоном, *n*-диметиламинобензальдегидом и данными УФ-спектроскопии. Обсуждается возможность использования аминоксисалкильных триэфирных аналогов олигонуклеотидов в качестве аффинных мутагенов.

В последние годы возрос интерес к модифицированным по фосфатным остаткам производным олигонуклеотидов, которые могут использоваться как молекулярные зонды и аффинные реагенты при исследовании структуры и функции нуклеиновых кислот в живой клетке [1–3]. В настоящей работе сообщается о синтезе триэфирных аналогов олигонуклеотидов, которые отличаются от описанных ранее производных [4–6] присутствием аминоксигруппы, реакционноспособной по отношению к компонентам нуклеиновых кислот [7].

Ключевой стадией синтеза, приводящей к введению в состав ди(дезоксинуклеозид) фосфатов аминоксисалкильных групп, является перэтерификация хлорфениловых эфиров (схема 1). Реакция протекает в соответствующем спирте в присутствии фтористого цезия [4–7]. Защищенные производные (Ia–r) синтезировали известными методами [8].

Схема 1



а) B¹=B²=Thy

б) B¹=Thy, B²=bzCyt

в) B¹=bzAde, B²=Thy

г) B¹=ibGua, B²=Thy

а) B³=B⁴=Thy

б) B³=Thy, B⁴=Cyt

в) B³=Ade, B⁴=Thy

г) B³=Gua, B⁴=Thy

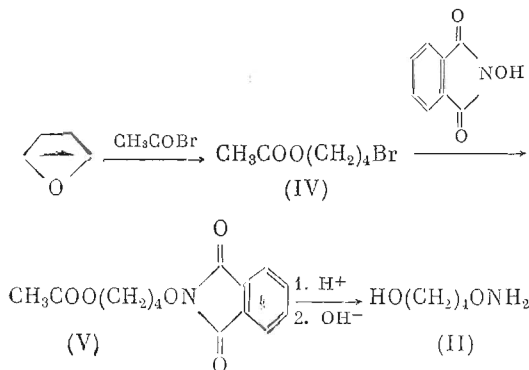
В предварительных экспериментах был показано, что аминоксигруппа *O*-алкилгидроксиламинов не мешает взаимодействию хлорфениловых эфиров ди(дезоксинуклеозид) фосфатов со спиртами, не взаимодействует в условиях эксперимента с защищенными гетероциклическими основания-

Сокращения: NH₂OBu – 4-аминоксibuтил, ClPh – 4-хлорфенил, Me₂NPh – 4-диметиламинофенил, ib – изобутирил.

ми и не разрушает образующийся триэфирный узел, несущий алкильный заместитель. Например, реакция хлорфенилового эфира $\text{Tr}(\text{C1Ph})\text{T}(\text{Ac})$ с этанолом гладко протекала как в описанных ранее условиях [4], так и в присутствии *O*-(4-аминоксипутил)гидроксиламина. Защищенные по гетероциклическому основанию и остатку сахара нуклеозиды $\text{bzC}_d(\text{Bz})$, $\text{T}_d(\text{Ac})$, $\text{bzA}(\text{Ac})_2$ и $\text{ibG}(\text{Ac})_2$, а также этиловый эфир дитимиделилфосфата, как показано с помощью ТСХ, устойчивы к действию 4-аминоксипутианола в условиях алкоголиза фосфата (1–2 ч, 20° С, CsF). Лишь при длительной инкубации (60 ч, 20° С) наблюдалось превращение защищенных по основаниям нуклеозидов в соединения с меньшими хроматографическими подвижностями. Эти данные указывают на возможность введения в реакцию переэтерификации незамещенного по аминоксигруппе спирта (II).

Исходным соединением в синтезе 4-аминоксипутианола (II) служил тетрагидрофуран (схема 2). Его взаимодействие с бромистым ацетилом

Схема 2



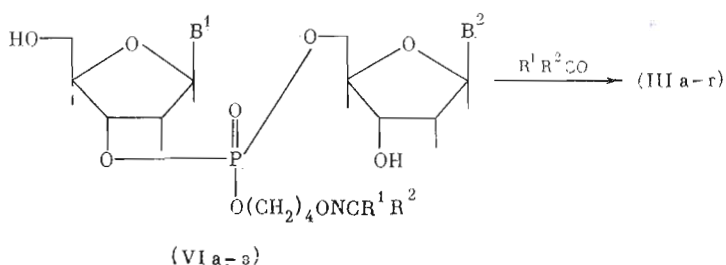
привело к получению бромиды (IV) [9], несущего ацелированную оксигруппу. Включение в молекулу остатка гидроксиламина осуществлено путем алкилирования *N*-оксифталмида. После снятия защитных групп в производном (V) получен спирт (II), индивидуальность которого подтверждена с помощью ТСХ. Присутствие аминогруппы в производном (II) доказано реакцией с пикрилхлоридом. При орошении хроматограмм спиртовым раствором этого вещества *O*-алкилгидроксиламина проявляются в виде темно-коричневых пятен. Структура вещества подтверждена данными спектроскопии ПМР. В спектрах наблюдаются три группы сигналов, принадлежащие к «внутренним» (β - и γ -) и «концевым» α - и δ -метиленовым группам с хим. сдвигами δ 1,4 и 3,4 м.д. соответственно, а также к протонам H_2NO - и HO -групп, сигналы которых сливаются, как и в случае аминоксипутилов [5], в один синглет при δ 5,0 м.д.

Реакцию переэтерификации хлорфенильных производных (Ia–г) проводили в растворе реагента в присутствии CsF , взятого в 10–15-кратном мольном избытке. По данным ТСХ, превращение исходных соединений в аминоксипутиловые эфиры протекает количественно за 45–60 мин при комнатной температуре. Продукты реакции содержат остатки гидроксиламина, дезоксирибозы и гетероциклических оснований, на что указывают качественные пробы с пикрилхлоридом и реактивом Динше [10], а также поглощение в УФ-свете. Снятие защитных групп осуществляли аммонолизом в течение 2 сут при 20° С [6]. В реакционной смеси преобладали аминоксипутиловые эфиры ди(дезоксинуклеозид)фосфатов (IIIa–г), выделенные обращенно-фазовой хроматографией.

Аминоксигруппа в производных (IIIa–г) легко обнаруживается по ее способности вступать в реакцию с альдегидами и кетонами (схема 3). Так, при обработке соединений ацетоном или *n*-диметиламинобензальдегидом происходит быстрое образование соответствующих оксимов (VIIa–з), что можно наблюдать с помощью ТСХ. Исходные вещества (IIIa–г), поглощающие в УФ-свете и дающие положительные реакции с реактивом Динше и пикрилхлоридом, при этом исчезают с одновременным на-

коплением более липофильных оксимов, также обнаруживаемых по поглощению в УФ-свете и реакцией Динше, но не окрашиваемых пикрилхлоридом.

Схема 3



- а) $B^1=B^2=\text{Thy}$, $R^1=R^2=\text{CH}_3$
- б) $B^1=B^2=\text{Thy}$, $R^1=\text{H}$, $R^2=\text{Me}_2\text{NPh}$
- в) $B^1=\text{Thy}$, $B^2=\text{Cyt}$, $R^1=R^2=\text{CH}_3$
- г) $B^1=\text{Thy}$, $B^2=\text{Cyt}$, $R^1=\text{H}$, $R^2=\text{Me}_2\text{NPh}$
- д) $B^1=\text{Ade}$, $B^2=\text{Thy}$, $R^1=R^2=\text{CH}_3$
- е) $B^1=\text{Ade}$, $B^2=\text{Thy}$, $R^1=\text{H}$, $R^2=\text{Me}_2\text{NPh}$
- ж) $B^1=\text{Gua}$, $B^2=\text{Thy}$, $R^1=R^2=\text{CH}_3$
- з) $B^1=\text{Gua}$, $B^2=\text{Thy}$, $R^1=\text{H}$, $R^2=\text{Me}_2\text{NPh}$

Реакция с *n*-диметиламинобензальдегидом использована для количественного определения аминооксигрупп в составе нуклеотидных производных. Как видно из таблицы, область поглощения диметиламинобензилиденовой группировки мало пересекается с областью поглощения гетероциклических оснований нуклеотидов. Измеряя оптическую плотность в максимумах поглощения и учитывая значения коэффициентов молярного поглощения нуклеозидных и диметиламинобензилиденовых остатков, удастся определить соотношение составных частей молекул полученных соединений, что может служить дополнительным подтверждением их структуры. Полученные данные (см. таблицу) хорошо согласуются с ожидаемыми.

При конструировании аффинных реагентов необходимо учитывать вероятность внутримолекулярных превращений, затрагивающих гетероциклические основания адресующей части молекулы. Для проверки такой возможности аминооксиалкиловые производные (IIIa-г) инкубировали в нейтральных водных растворах в течение 3 сут при 20° С. При этом не обнаруживалось каких-либо изменений в их УФ-спектрах. Это может свидетельствовать о том, что реакции внутримолекулярного взаимодействия гетероциклических оснований с остатком гидросиламина затруднены так же, как и в описанных ранее алкилирующих производных олигонуклеотидов [12]. Лишь при более длительной инкубации наблюдался частичный гидролиз триэфирных производных с образованием 4-аминоксидутианола-1, обнаруживаемого ТСХ.

Представленный способ получения аминооксиалкиловых эфиров олигонуклеотидов может быть, очевидно, распространен и на синтез производных олигонуклеотидов другой длины и состава. Эти соединения могут проявлять свойства аффинных мутагенов. Они содержат остаток гидросиламина, который, по-видимому, независимо от способа его замещения по оксигруппе сохраняет мутагенные свойства [13, 14]. Предлагаемый метод включения мутагенной группировки обеспечивает одновременное алкилирование межнуклеотидных фосфатных групп олигонуклеотидов. Такие алкильные триэфирные производные олигонуклеотидов, как показано ранее [1, 6], способны к специфическому связыванию с нуклеиновыми кислотами, однако в отличие от олигонуклеотидов природного строения проникают через мембрану клеток эукариот и устойчивы к действию нуклеаз, что позволяет рассчитывать на использование их *in vivo*.

Хроматографические и спектральные свойства триэфирных производных олигонуклеотидов

| Соединение | Выход, % | R_f в системе | | $\lambda_{\text{макс}}$ ($\lambda_{\text{мин}}$), нм (рН 13) | Данные анализа * |
|------------|----------|-----------------|------|---|------------------|
| | | Б | В | | |
| (IIIa) | 60 | 0,2 | | 265 (232) | 1:1,04 |
| (IIIб) | 50 | 0,15 | | 267 (235) | 1:0,99 |
| (IIIв) | 30 | 0,2 | 0,3 | 260 (230) | 1:1,02 |
| (IIIг) | 40 | 0,09 | 0,2 | 255 (227) | 1:1,07 |
| (VIa) | | 0,38 | | | |
| (VIб) | | 0,4 | | 270,310 (242,295) | |
| (VIв) | | 0,23 | | | |
| (VIг) | | 0,3 | | 272,310 (247, 295) | |
| (VIд) | | 0,3 | | | |
| (VIе) | | 0,4 | | 260,310 (240,288) | |
| (VIж) | | | 0,33 | | |
| (VIз) | | | 0,4 | 270,310 (245,296) | |

* Соотношение суммы 5'- и 3'-концевых нуклеозидных фрагментов и аминоксигрупп определяли спектрофотометрически для *n*-диметиламинобензилденных производных, используя суммарные коэффициенты молярного поглощения нуклеозидов [11].

Экспериментальная часть

Полностью защищенные хлорфенильные производные олигонуклеотидов получали триэфирным методом [8]. Для снятия 5'-метокситригильной группы использовали трихлоруксусную кислоту. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках размером 3,0×6,5 см Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck) в системах: CHCl₃ — CH₃OH, 9 : 1 (А), CHCl₃ — CH₃OH, 8 : 2 (Б), CHCl₃ — CH₃OH, 7,5 : 2,5 (В).

Положение веществ, поглощающих в УФ-свете, определяли на ультра-лемископе; производные, содержащие 2'-дезоксирибозу и аминоксигруппы, обнаруживали на хроматограммах реактивом Дише [9] и 1% раствором хлористого пикрила в этаноле соответственно.

Адсорбент для обращенно-фазовой хроматографии получен как описано в работе [15] и любезно предоставлен В. В. Самуковым. Колонку с адсорбентом (1,1×40 см) элюировали буферным раствором А (0,01 М ацетат аммония, рН 7,5) с линейно возрастающим содержанием ацетонитрила.

Другие материалы и методы описаны в предыдущих работах [4–6].

4-Аминооксибутанол (II). Смесь 80 г N-оксифталимида, 100 г 4-бромбутилацетата [9], 200 мл абс. диметилформамида и 70 мл триэтиламина инкубировали 16 ч при 20° С и затем 0,5 ч при 100° С. Охлажденную смесь выливали в 2 л воды. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили на воздухе. Полученный N-(4-ацетилоксибутилокси)фталимид (120 г) обрабатывали 135 мл уксусной кислоты и 75 мл конц. HCl при кипячении в течение 45 мин, смесь охлаждали, выпавшую фталевую кислоту отфильтровывали. Фильтрат концентрировали и отгоняли избыток кислоты с водой (5×100 мл). Твердый остаток растворяли в 100 мл воды, доводили рН смеси до 13–14 твердым NaOH и извлекали целевой продукт эфиром в приборе для непрерывной экстракции. Экстракцию контролировали ТСХ в системе А. Эфирные вытяжки концентрировали и остаток перегоняли в вакууме. Выход 22 г (50%). Т. кип. 140–144° С (13 мм рт. ст.), 109–110° С (8 мм). n_D^{20} 1,4625. ПМР (DMSO-d₆, δ , м.д.): 1,4 м (4 H, 2-CH₂ и 3-CH₂), 3,4 м (4 H, 1-CH₂ и 4-CH₂), 5,0 с (3 H, NH₂ и OH). Найдено, %: С 46,35; Н 10,45; N 12,63. С₄H₁₁O₂N₂. Вычислено, %: С 45,70; Н 10,54; N 13,32.

4-Аминооксибутиловые эфиры динуклеозидфосфатов (общая методика). К смеси 20–50 мкмоль хлорфенилового эфира динуклеозидфосфата и 2–5 ммоль спирта (II), высушенной отгонкой абс. пиридина (3×1 мл), добавляли 0,2–0,5 ммоль свежепрокаленного фтористого цезия. Плотно за-

купоренную колбу интенсивно встряхивали 5 мин и оставляли при 20° С на 45 мин. За превращением следили с помощью ТСХ в системе А. Смесь разбавляли 5 мл хлороформа и экстрагировали избыток спирта (II) и CsF водой (3×2 мл) (при получении триэфира (IIIa) спирт (II) отделяли экстракцией эфиром (3×5 мл)). Органическую фазу упаривали, остаток растворяли в 0,5 мл пиридина, добавляли 2 мл конц. водного аммиака и инкубировали раствор 2 сут при 20° С. Смесь упаривали и остаток растворяли в буферном растворе А, содержащем 5 мл 10% ацетонитрила, до концентрации около 100 ОЕ₂₆₀/мл. Раствор наносили на колонку для обращенно-фазовой хроматографии и промывали ее буферным раствором А с линейно возрастающим содержанием ацетонитрила: 5–25% для (IIIa), 5–20% для (IIIб), 10–15% для (IIIв) и 10–40% для (IIIг) (по 100 мл в каждом случае). Фракции, содержащие целевые вещества, объединяли и упаривали совместно с 0,1 мл конц. NH₄OH до концентрации 100 ОЕ₂₆₀/мл. Дальнейшую очистку соединений проводили повторной хроматографией, промывали колонку буферным раствором А, содержащим ацетонитрил с линейным градиентом концентрации 13–18% для (IIIa), 10–14% для (IIIб), 25–30% для (IIIв) и 15–20% для (IIIг) (по 100 мл). Для обессоливания фракции разбавляли в 3 раза водой и наносили на колонку, которую затем промывали последовательно водой (50 мл) и 80% водным ацетонитрилом (25–30 мл). Полученные растворы с соединениями (IIIa–г) упаривали совместно с 0,1 мл конц. NH₄OH. Выходы и характеристики веществ представлены в таблице.

n-Диметиламинобензильденные производные 4-аминооксибутиловых эфиров динуклеозидфосфатов (общая методика). К 25–30 ОЕ₂₆₀ аминоксипроизводного (IIIa–г) в 0,2 мл 50% водного этанола добавляли 15 мл *n*-диметиламинобензальдегида и инкубировали смесь 1 ч при 20° С. Остаток после упаривания промывали эфиром (3×3 мл), растворяли в 1 мл 0,01 М раствора ацетата аммония, рН 7,5, содержащем 10 или 25% ацетонитрила, и наносили на колонку для обращенно-фазовой хроматографии. Колонку промывали буферным раствором А, содержащим ацетонитрил с линейным градиентом концентрации 10–40% для (VIб) и (VIг) или 25–60% для (VIе) и (VIз) (по 100 мл). Фракции с нуклеотидным материалом объединяли и упаривали. УФ-спектры оксимов снимали после растворения их в 50% водном этаноле, содержащем 0,1 М NaOH. Характеристики соединений приведены в таблице.

ЛИТЕРАТУРА

1. Miller P. S., Braiter L. T., Ts'o P. O. P. Biochemistry, 1977, v. 16, № 9, p. 1988–1996.
2. Karova G. G., Knorre D. G., Ryte A. S., Stephanovich L. E. FEBS Lett., 1980, v. 122, p. 21–24.
3. Jayaraman K., McPaland K., Miller P., Ts'o P. O. P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 3, p. 1537–1541.
4. Петренко В. А., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. Н. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 431–435.
5. Данилюк Н. К., Петренко В. А., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. Н. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 5, с. 703–709.
6. Данилюк Н. К., Петренко В. А., Поздняков П. И., Попов С. Г., Сиволобова Г. Ф., Шубина Т. Н. Молекулярн. биология, 1982, т. 16, № 5, с. 1116–1120.
7. Ogilvie K. K., Beaucage S. L. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 3, p. 805–823.
8. Narang S. A., Brousseau R., Hsiung H. M., Michniewicz J. J. Methods in Enzymol., 1979, v. 65, part 1, 610–620.
9. Арбузов А. Е., Жармухаметова Д. Х. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1960, с. 1767–1971.
10. Хроматография на бумаге/Ред. Хайс И. М., Мацек К. М.: ИЛ, 1962. с. 746.
11. Итоги науки и техники. Молекулярная биология, т. 14. М.: ВИНТИ, 1977, с. 123–176.
12. Гринева Н. Л. Вестн. АМН СССР, 1981, № 2, с. 1–96.
13. Widowsky E. I. Prog. Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol., 1976, v. 16, p. 125–188.
14. Петренко В. А., Гусев В. А., Семенова Л. Н. Молекулярн. биология, 1982, т. 16, № 3, с. 637–643.
15. Калашиников В. В., Самуков В. В., Шубина Т. Н., Ямщиков В. Ф. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 666–672.

Поступила в редакцию
27.X.1982

SYNTHESIS OF TRIESTER ANALOGS OF DI(DEOXYNUCLEOSIDE)PHOSPHATES
CONTAINING HYDROXYLAMINE RESIDUE

PETRENKO V. A., POZDNYAKOV P. I.

*All-Union Institute of Molecular Biology, Kol'tsovo,
Novosibirsk Region*

4-Aminooxybutyl esters of di(deoxynucleoside)phosphates d[Tp(NH₂OBU)T], d[Tp(NH₂OBU)C], d[Ap(NH₂OBU)T] and d[Gp(NH₂OBU)T] were obtained. The key stage in synthesis was transesterification of chlorophenyl esters of di(deoxynucleoside)phosphate blocked derivatives in the presence of CsF and 4-aminooxybutanol-1. The latter was prepared from tetrahydrofuran with the 50% yield. The aminooxygroup did not react with the nucleoside residue of di(deoxynucleoside)phosphates as was shown by TLC and UV-spectroscopy. The compounds were obtained after reversed phase chromatography with 30—60% yield. Their structures were confirmed by UV-spectroscopy and by reactions with picryl chloride, acetone, *n*-dimethylaminobenzaldehyde, and Dishe reagent. The use of oligonucleotide aminooxyalkyl triester analogs as affinity mutagens is discussed.