БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 12 * № 7 * 1986

УДК 577.113(4 + 7)

# МОДИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ КОМПЛЕКСАХ

## I. СИНТЕЗ АЛКИЛИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ НА 5′-КОНЦЕ ОСТАТОК N-(2-ОКСИЭТИЛ)ФЕНАЗИНИЯ

*Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Сильников В.Н., Шишкин Г.В.*

*Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения Академии наук СССР*

Разработан метод синтеза реакционноспособных производных олигодезоксирибонуклеотидов нового типа (Phn)NH$(CH_2)_2$NHp*N*-*N*...*N* - r*N*(RCl), содержащих в своем составе одновременно алкилирующую 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиденовую (RCl) группу и остаток N-(2-оксиэтил)феназиния (Phn), основанный на взаимодействии $Phn^+Cl^-$ с алифатической аминогруппой, введенной по 5′-концевому фосфату алкилирующего производного олигодезоксирибонуклеотида. Показано, что температура плавления комплекса производного олигонуклеотида (Phn)NH$(CH_2)_n$NHpC-C-A-A-A-C-rA ($n$ = 2—7) с комплементарным додекануклеотидом pA-A-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C на 13—19° С выше, чем в случае самого олигонуклеотида pC-C-A-A-A-C-rA.

Одним из подходов к направленному воздействию на генетический аппарат клетки является комплементарно-адресованная модификация нуклеиновых кислот с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов [1—3]. Эффективность такого воздействия во многом определяется стабильностью образующегося комплекса между олигонуклеотидным реагентом и модифицируемым участком нуклеиновой кислоты [2]. Использование производных олигонуклеотидов с присоединенными по фосфатным группам гетероароматическими полициклическими системами является одним из вариантов стабилизации комплементарного комплекса [4—6].

В данной работе с целью дальнейшего изучения комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот в стабилизированном комплексе предложен и разработан метод синтеза производных олигодезоксирибонуклеотидов, одновременно содержащих в своем составе алкилирующую 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиденовую группу по 2′,3′-*цис*-диольной группировке 3′-концевого рибонуклеотида и остаток N-(2-оксиэтил)феназиния, присоединенный через этилендиаминовый фрагмент к 5′-концевому фосфату олигонуклеотида.

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 5′-концевую фосфатную группу, осуществляли фосфотриэфирным методом с использованием N-ацил-3′-О-левулинил-5′-*п*-хлорфениловых эфиров 5′-моно- и динуклеотидов [7]. Остаток рибоаденозина вводили на 3′-конец олигонуклеотидов в ходе синтеза, применяя в качестве Р-компонента *п*-хлорфениловый эфир N-2′,3′-О-триацетилрибоаденозин-5′-фосфата. Использованные в данной работе олигонуклеотиды pC-C-A-A-A-C-rA (I), pT-T-C-C-C-rA (II), pT-C-T-T-C-C-C-rA (III), pA-A-C-rA (IV) и pA-A-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C (V), по данным обращенно-фазовой хроматографии и электрофореза в ПААГ, содержали не более 5% примесей.

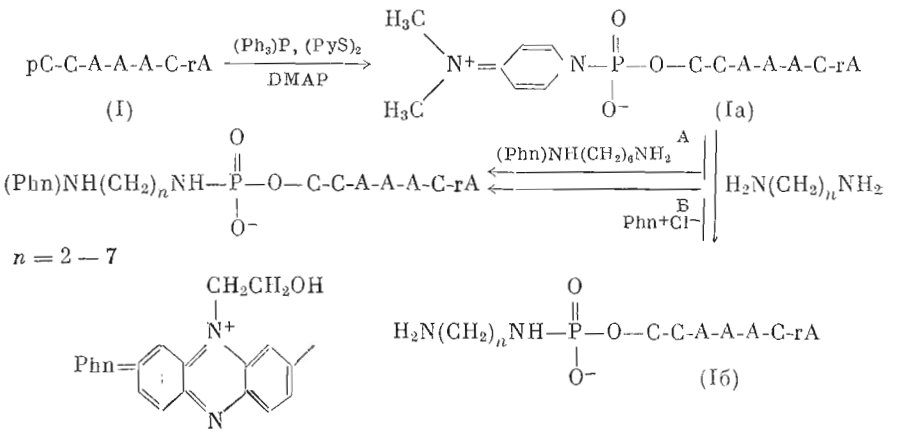
---

Сокращения: RCl — 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиденовая группа, Phn — остаток N-(2-оксиэтил)феназиния, $(Ph)_3P$ — трифенилфосфин, $(PyS)_2$ — 2,2′-дипиридилдисульфид, DMAP — 4-диметиламинопиридин, DMSO — диметилсульфоксид, символ d в аббревиатуре нуклеотидов опущен; rA — рибоаденозин.

Известно, что конденсированные ароматические системы, несущие в своем составе положительный заряд, являются эффективными интеркаляторами [8, 9]. В связи с этим конструирование производных олигодезоксирибонуклеотидов, обладающих способностью образовывать комплементарный комплекс повышенной прочности, мы начали с введения в олигонуклеотиды остатка N-(2-оксиэтил)феназиния (схема 1). Важной характеристикой четвертичных солей феназина является легкость замещения атома водорода в положении 2 на аминогруппы [10]. Это свойство красителя было использовано нами при введении остатка N-(2-оксиэтил)-феназиния в структуру олигодезоксирибонуклеотидов.

В литературе [4, 5] имеются указания на то, что на стабильность комплементарного комплекса, образованного полиаденилово̆й кислотой и олиготимидилатом, содержащим остатки акридина, влияет длина полиметиленового звена, соединяющего акридин с олигонуклеотидом. В нашей работе длина полиметиленового фрагмента изменялась за счет введения по концевому фосфату олигодезоксирибонуклеотидов различных полиметилендиаминов (от этилендиамина до гептаметилендиамина). Для получения производных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих алифатическую аминогруппу, был использован недавно предложенный способ получения активных фосфамидов олигонуклеотидов, способных к быстрому взаимодействию с алифатическими аминами [11]. Последовательность превращений на примере гептануклеотида (I) представлена на схеме 1.

*Схема 1*




Введение Phn в алкилирующие производные (VI)—(IX) олигодезоксирибонуклеотидов (I)—(IV) осуществляли по варианту Б:

| | | | |
|---|---|---|---|
| pC-C-A-A-A-C-rA (RCl) | (VI) | pT-T-C-C-C-rA(RCl) | (VII) |
| pT-C-T-T-C-C-C-rA (RCl) | (VIII) | pA-A-C-rA(RCl) | (IX) |

Олигонуклеотид (I) обрабатывали смесью трифенилфосфина и 2,2′-дипиридилдисульфида в присутствии 4-диметиламинопиридина. По данным работы [11], в выбранных условиях олигонуклеотид (I) быстро и количественно превращается в 4-диметиламинопиридиниевое производное (Ia). Это обеспечивает активацию 5′-концевого фосфата олигонуклеотида и позволяет эффективно проводить реакции с полиметилендиаминами при получении производных (Iб), содержащих алифатическую аминогруппу. Выход соединений (Iб), по данным хроматографии, составляет 80—95% (рис. 1 и 2). Хроматографические свойства соединений (Iб) не противоречат их структуре. Все синтезированные фосфамиды (Iб) при ионообменной хроматографии элюируются раньше, а при обращенно-фазовой хроматографии позже, чем исходный олигонуклеотид (I) (рис. 1, 2). Длина полиметиленового фрагмента также влияет на подвижность соединений (Iб) при хроматографии, но в меньшей степени, чем уменьшение числа отрицательных зарядов.

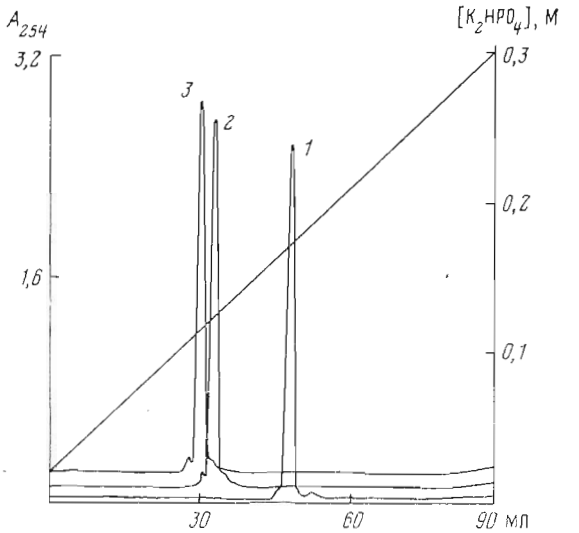



Рис. 1. Ионообменная хроматография гептануклеотида (I) (*1*) и реакционных смесей при синтезе соединений (Iб) с $n = 2$ (*2*) и $n = 7$ (*3*). Колонка (4,6 × 250 мм) с сорбентом Полисил СА 10 мкм, градиент 0,02 → 0,3 М $K_2HPO_4$, pH 6,5 в 30% ацетонитриле

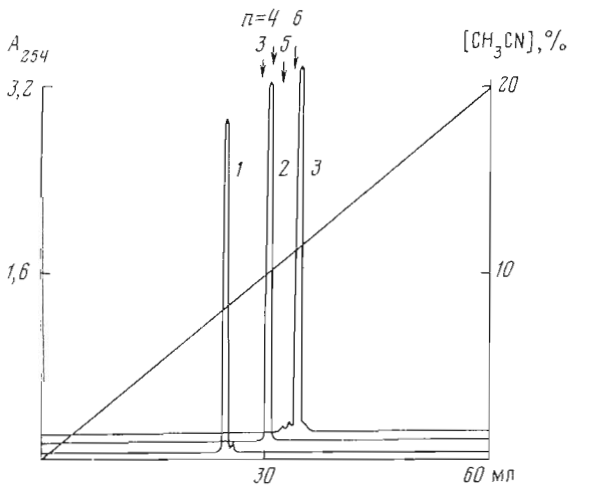



Рис. 2. Обращенно-фазовая хроматография гептануклеотида (I) (*1*) и его производных (Iб) с $n = 2$ (*2*) и с $n = 7$ (*3*), выделенных ионообменной хроматографией из реакционных смесей (рис. 1). Стрелками указаны места выхода производных (Iб) с $n = 3—6$ при аналогичной хроматографии. Колонка (4,6 × 250 мм) с носителем Lichrosorb RP-18 10 мкм, градиент 0 → 20% ацетонитрила в 0,05 М $LiClO_4$

Введение остатка четвертичной соли феназина по алифатической $NH_2$-группе соединений (Iб, $n = 2—7$) осуществляли с использованием реакции прямого нуклеофильного замещения атома водорода во втором положении хлорида N-(2-оксиэтил)феназиния на аминогруппу в соответствии со схемой 1. Олигонуклеотидный материал после обработки четвертичной солью феназина отделяли от избытка красителя и целевые продукты выделяли обращенно-фазовой хроматографией (рис. 3). Таким способом синтезированы и выделены феназиниевые производные гептануклеотида (Iв) с содержанием метиленовых групп от 2 до 7. Выход соединений (Iв), оцененный по данным хроматографии, составлял 80—90%. Доказательством структуры полученных соединений (Iв) послужили следующие данные. Присоединение остатка красителя происходит только по предварительно введенной в молекулу олигонуклеотида первичной алифатичес-

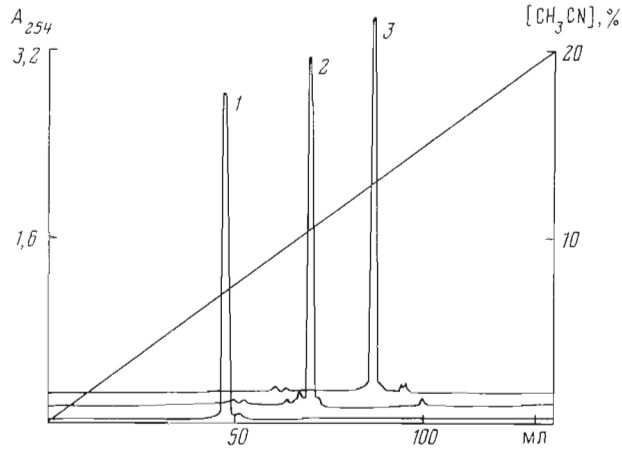



Рис. 3. Обращенно-фазовая хроматография гептануклеотида (I) (*1*) и реакционных смесей при синтезе соединений (Iв) с $n = 2$ (*2*) и $n = 7$ (*3*) (см. схему 1). Условия разделения см. на рис. 2

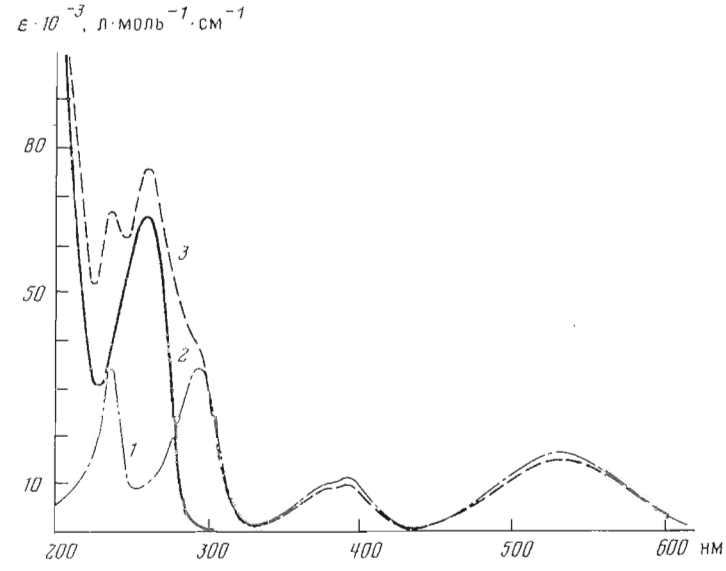



Рис. 4. Электронные спектры поглощения соединений: хлорида 2-[(6-аминогексил)амино]-10-(2-оксиэтил)феназиния (*1*), гептануклеотида (I) (*2*) и его феназиниевого производного (Iв) с $n = 6$ (*3*) в 0,2 М водном растворе NaCl, pH 7,4 (0,01 М трис-HCl)

кой аминогруппе. Исходный олигонуклеотид (I) не взаимодействует с хлоридом N-(2-оксиэтил)феназиния в условиях синтеза (Iв). Соединение (Iв) ($n = 6$) было получено «встречным» синтезом, исходя из хлорида 2-[(6-аминогексил)амино]-10-(2-оксиэтил)феназиния (см. «Экспериментальную часть»), содержащего первичную алифатическую аминогруппу, и активного фосфамида (Iа) (схема 1). Физико-химические характеристики соединения (Iв) с $n = 6$, полученного двумя разными способами, совпадают полностью. Наличие остатка феназиния в соединениях (Iв) приводило к тому, что при обращенно-фазовой хроматографии время их удерживания увеличивалось по сравнению с исходными производными (Iб). С ростом полиметиленовой цепи хроматографическая подвижность соединений (Iв), как и в случае соединений (Iб), несколько уменьшалась (рис. 3). Из данных рис. 4 и табл. 1 видно, что в электронном спектре поглощения производных (Iв) регистрируются максимумы поглощения, характерные для олигонуклеотида в области 260 нм и для хлорида 2-[(6-аминогексил)-амино]-10-(2-оксиэтил)феназиния в области 237, 290 (плечо), 390 и 530 нм.

*Таблица 1*

**Спектральные характеристики олигонуклеотидов и их производных**

| Олигонуклеотид | | $\varepsilon_{260} \cdot 10^{-3}$, л·моль$^{-1}$·см$^{-1}$ | $\lambda_{min}$, нм | $\lambda_{max}$, нм |
|---|---|---|---|---|
| pC-C-A-A-A-C-rA (I) | | 66 | 229 | 260 |
| (Phn)NH$(CH_2)_n$NHpC-C-A-A-A-C-rA (Iв) | $n=2$ | 75 | 225, 245, 432 | 237, 261, 393, 536 |
| | $n=3$ | 75 | 225, 245, 434 | 237, 261, 393, 541 |
| | $n=4$ | 76 | 225, 245, 430 | 237, 261, 390, 530 |
| | $n=5$ | 75 | 225, 245, 430 | 238, 261, 389, 530 |
| | $n=6$ | 75 | 225, 245, 430 | 237, 261, 389, 530 |
| | $n=7$ | 76 | 225, 245, 430 | 237, 262, 389, 529 |
| pC-C-A-A-A-C-rA(RCl) (VI) | | 96 | 228 | 261 |
| (Phn)NH$(CH_2)_2$NHpC-C-A-A-A-C-rA(RCl) (VIв) | | 106 | 226, 244 | 239, 263, 402, 541 |
| pT-T-C-C-C-rA (II) | | 51 | 233 | 265 |
| pT-T-C-C-C-rA(RCl) (VII) | | 70 | 232 | 265 |
| (Phn)NH$(CH_2)_2$NHpT-T-C-C-C-rA(RCl) (VIIв) | | 76 | 227, 246 | 237, 268, 396, 530 |
| pT-C-T-T-C-C-C-rA (III) | | 65 | 233 | 265 |
| pT-C-T-T-C-C-C-rA(RCl) (VIII) | | 86 | 233 | 266 |
| (Phn)NH$(CH_2)_2$NHpT-C-T-T-C-C-C-rA(RCl) (VIIIв) | | 93 | 228, 245 | 237, 267, 400, 533 |
| pA-A-C-rA (IV) | | 45 | 228 | 259 |
| pA-A-C-rA(RCl) (IX) | | 68 | 228 | 261 |
| (Phn)NH$(CH_2)_2$NHpA-A-C-rA(RCl) (IXв). | | 78 | 225, 244 | 237, 263, 400, 533 |
| Хлорид 2-[(6-аминогексил)амино]-10-(2-оксиэтил)феназиния | | 10 | 252, 427 | 237, 295, 394, 530 |

* Молярный коэффициент поглощения в случае алкилирующих производных олигонуклеотидов определялся для смеси диастереомеров.

Влияние остатка феназина и длины полиметиленового фрагмента в полученных соединениях на стабильность комплексов оценивали путем сравнения температур плавления комплементарных комплексов А и Б, образованных с участием додекануклеотида (V) и гептануклеотида (I) или его феназиниевого производного (Iв) соответственно (схема 2).

*Схема 2*

5′ pA-A-C-C-T-G-T-T-T-T-G-G-C 3′ (V)

А

3′ rA-C-A-A-A-C-Cp 5′ (I)

5′ pA-A-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C 3′ (V)

Б

3′ rA-C-A-A-A-C-CpNH$(CH_2)_n$NH(Phn) (Iв)

где $n = 2—7$

Из сравнения данных, представленных в табл. 2, видно, что в одинаковых условиях (ионная сила, концентрация олигонуклеотидов и их производных) величина $T_m$ комплекса Б, образованного с участием олигонуклеотидного производного с ковалентно присоединенным остатком красителя (Iв), на 13—19° С выше $T_m$ комплекса А. Влияние длины полиметиленового фрагмента в пределах $n = 2—7$ на величину $T_m$ комплекса типа Б невелико. Следует также отметить, что четвертичная соль феназина, ковалентно не присоединенная к олигонуклеотиду (I), не оказывает заметного влияния на стабильность комплекса А. Эффекта стабилизации не на-

*Таблица 2*

**Температуры плавления комплементарных комплексов олигонуклеотидов и их производных * в 0,2 М NaCl, pH 7,4 (0,01 М трис-HCl)**

| Комплементарный комплекс | $T_m$, °C | Комплементарный комплекс | $T_m$, °C |
|---|---|---|---|
| (V)·(I) | 28 | (V)·(Iв, $n$=4) | 44 |
| | (28) ** | (V)·(Iв, $n$=5) | 43 |
| (V)·(Iб, $n$=6) | 28 | (V)·(Iв, $n$=6) | 43 |
| (V)·(Iв, $n$=2) | 47 | (V)·(Iв, $n$=7) | 41 |
| (V)·(Iв, $n$=3) | 45 | | |

* Концентрация олигонуклеотидов и их производных во всех случаях $2{,}2 \cdot 10^{-5}$ М.
** Температура плавления комплекса (V)·(I) в присутствии хлорида 2-[(6-аминогексил)-амино]-10-(2-оксиэтил)феназиния (конц. красителя $2{,}2 \cdot 10^{-6}$ М).

блюдается и в случае комплементарного комплекса, образованного с участием модифицированного олигонуклеотида (Iб) ($n$ = 6) (табл. 2). Полученные данные позволяют заключить, что основной вклад в стабилизацию комплекса типа Б вносит остаток красителя. Такой вывод согласуется с ранее полученными данными по влиянию остатка акридина, присоединенного к олиготимидилату, на комплекс с полиаденилловой кислотой [4, 5]. Однако в исследованной нами системе увеличение длины полиметиленового звена приводит к снижению $T_m$ комплементарного комплекса, а в случае с акридином [4, 5], наоборот, к некоторому увеличению.

Разработанный подход был использован для синтеза реагентов, содержащих в своей структуре помимо остатка красителя остаток ароматического азотистого иприта. Алкилирующие производные олигонуклеотидов были синтезированы путем введения остатка 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегида по 2′,3′-*цис*-диольной группировке олигонуклеотидов (I)—(IV) в присутствии трифторуксусной кислоты и 2,2-диметоксипропана [12]. Бензилиденовая группировка у образующихся соединений (VI)—(IX) кислотолабильна [13], поэтому продукты реакции выделяли обращенно-фазовой хроматографией в слабощелочном (pH 8) TEAB (рис. 5). Во всех случаях при выделении производных (VI)—(IX) наблюдалось раздвоение хроматографического пика целевого продукта. Вероятно, это связано с существованием соединений (VI)—(IX) в виде смеси двух диастереомеров, которые обусловлены появлением нового асимметрического атома углерода при образовании бензилиденового производного. Такие изомеры, вероятно, могут быть разделены с помощью ВЭЖХ, однако вся дальнейшая работа была проведена на их смеси. Выход образующихся 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиденовых производных олигонуклеотидов, согласно данным хроматографии, составлял 60—90%. Наличие активного хлора в алкилирующем остатке соединений (VI)—(IX) определяли исчерпывающей реакцией выделенного продукта с тиосульфатом натрия. Данные реакции свидетельствуют о том, что все реагенты содержат активный хлор и способны к реакции с тиосульфатом (не менее чем на 95%).

Введение алифатической аминогруппы в соединения (VI)—(IX), содержащие алкилирующий остаток, осуществляли в тех же условиях, что и синтез производных (Iб) (схема 1). Поскольку увеличение длины полиметиленового фрагмента в соединениях (Iв) не способствует стабилизации комплекса (табл. 2), в данном случае использовали только этилендиамин. Реакция, несмотря на наличие в соединениях (VI)—(IX) активной алкилирующей группировки, протекает без осложнений и практически количественно. Образующиеся производные олигонуклеотидов, $NH_2(CH_2)_2NH$pC-C-A-A-A-C-rA(RCl) (VIб), $NH_2(CH_2)_2NH$pT-T-C-C-C-rA(RCl) (VIIб), $NH_2(CH_2)_2NH$pT-C-T-T-C-C-C-rA(RCl) (VIIIб), $NH_2(CH_2)_2NH$pA-A-C-rA(RCl) (IXб), после выделения из реакционной смеси осаждением раствором перхлората лития в ацетоне [14] без последующей хроматографической очистки использовали в реакции с хлоридом N-(2-оксиэтил)феназиния. Условия и время реакции были близки к тако-

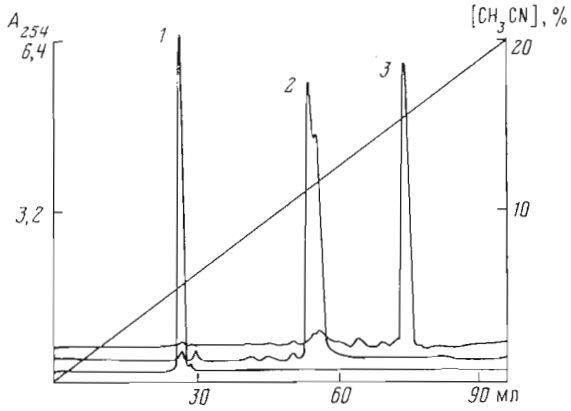



Рис. 5. Обращенно-фазовая хроматография гептануклеотида (I) (*1*) и реакционных смесей при синтезе алкилирующих производных (VI) (*2*) и (VIв) (*3*). Условия разделения см. на рис. 2

вым при синтезе феназиниевых производных (Iв). Выход модифицированных олигонуклеотидов (Phn)NH$(CH_2)_2$NHpC-C-A-A-A-C-rA(RCl) (VIв), (Phn)NH$(CH_2)_2$NHpT-T-C-C-C-rA(RCl) (VIIв), (Phn)NH$(CH_2)_2$NHpT-C-T-T-C-C-C-rA(RCl) (VIIIв), (Phn)NH$(CH_2)_2$NHpA-A-C-rA(RCl) (IXв), содержащих алкилирующую группу и остаток красителя, по данным хроматографии, составил 70—80% (рис. 5). В электронном спектре поглощения соединений (VIв)—(IXв), как и в случае производных (Iв), регистрируются максимумы поглощения, соответствующие олигонуклеотидной части и остатку красителя. Молярные коэффициенты поглощения полученных соединений (VIв)—(IXв) были определены с использованием метода радиоизотопной метки [15] (табл. 1). Производные (Iв), (VIв)—(IXв) визуально детектируются по характерному розовому окрашиванию их растворов. При выдерживании соединений (VIв)—(IXв) при pH 4 происходит отщепление бензилиденовой группировки менее чем за 3 ч (23° С) и превращение их в производные типа (Iв), не содержащие алкилирующего фрагмента. Наличие активного хлора в соединениях (VIв)—(IXв), как и в случае (VI)—(IX), было подтверждено по их практически количественной реакции с тиосульфатом натрия.

Сумма представленных данных свидетельствует о том, что разработанный метод позволяет с хорошим выходом получать производные олигонуклеотидов, содержащие в своем составе одновременно алкилирующую группу и остаток красителя.

По нашим данным, полученные соединения (VIв)—(IXв) являются более эффективными алкилирующими реагентами по сравнению с соединениями (VI)—(IX). Результаты использования соединений (VIв)—(IXв) для направленного алкилирования фрагментов нуклеиновых кислот будут опубликованы в последующих сообщениях.

## Экспериментальная часть

В работе использованы N-ацил-3′-О-левулинил-5′-*п*-хлорфенилфосфаты 5′-моно- и динуклеотидов, 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегид — продукты опытного химического производства НИОХ СО АН СССР; N-метилимидазол (Ega Chemie, ФРГ); полиметилендиамины, 2,2′-дипиридилдисульфид и трифенилфосфин (Fluka AG, Швейцария); фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1); Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 3.7.1.78); [$\gamma$-$^{32}$P]ATP (3000 Ки/ммоль) фирмы Amersham (Великобритания). Хлорид N-(2-оксиэтил)феназиния получен по методу [16].

ИК-спектры записывали на приборе UR-20 (ГДР) в таблетках KBr, спектры ПМР — на спектрометре Bruker-HX-90 (ФРГ). Электронные спектры поглощения олигонуклеотидов и их производных регистрировали при 23° С на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss Jena, ГДР) в следующих буферных растворах: олигонуклеотид (I) и его производные — 0,2 М водный NaCl, 0,01 М трис-HCl, pH 7,4; олигонуклеотиды (II), (III) и их производные — 0,1 М NaCl, 0,001 М EDTA, 0,01 М трис-HCl, pH 7,6; олигонуклеотид (IV) и соединения (IX), (IXв) — 0,2 М NaCl, 0,01 М

$MgCl_2$, 0,01 М трис-HCl, pH 7,4. Радиоактивность растворов $^{32}P$-меченых олигонуклеотидов просчитывали в воде, используя счетчик Mark III (Nuclear Chicago, США).

Выделение и очистку олигонуклеотидов и их производных проводили с помощью высокоэффективной ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии на хроматографе Altex-332 (США). Для ионообменной хроматографии использовали колонку (10 × 250 мм) со смолой Полисил СА [17], любезно предоставленной С. И. Ястребовым (ВНИИ МБ, п. Кольцово Новосибирской обл.), и градиент концентрации $K_2HPO_4$ (pH 6,5) от 0,02 до 0,3 М в 30% ацетонитриле. Для обращенно-фазовой хроматографии использовали колонки (10 × 250 и 4,6 × 250 мм) со смолой Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ) и градиент концентрации ацетонитрила от 0 до 20—50% в 0,05 М растворе $LiClO_4$ (либо в 0,05 М ТЕАВ, pH 8). Эффективность колонок до 40 000 т.т./м. Аналитическую ионообменную и обращенно-фазовую хроматографии в микроварианте проводили с использованием жидкостного хроматографа «Милихром» отечественного производства.

Кривые плавления комплементарных комплексов олигонуклеотидов (0,2 М водный раствор NaCl, 0,01 М трис-HCl, pH 7,4) регистрировали с помощью установки для исследования термической денатурации в ультрамикромасштабе, созданной в НИБХ СО АН СССР на базе спектрофотометра «Обь-4».

Олигонуклеотиды (I)—(III) синтезировали по модифицированной триэфирной схеме, описанной ранее [7]. Деблокирование целевых олигонуклеотидов проводили в два этапа: обработкой 0,3 М раствором тетрабутиламмонийфторида в 50% водном пиридине (pH 6,5) в течение 12 ч при 20° С, а затем 25% водным аммиаком (5 ч при 50° С) [18]. После деблокирования олигонуклеотиды выделяли высокоэффективной ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией. Додекануклеотид pA-A-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C [19] и тетрануклеотид pA-A-C-rA [20] были синтезированы ранее. Структура олигонуклеотидов была подтверждена методом химических модификаций [21].

Реакционную способность к алкилированию производных олигонуклеотидов (VI) — (IX) и (VIв) — (IXв), содержащих на 3′-конце цепи 2-хлорэтиламиногруппу, проверяли по реакции с тиосульфатом. Модифицированный олигонуклеотид в количестве 0,5—1 $OE_{260}$ растворяли в 100 мкл 1 М раствора $Na_2S_2O_3$, pH 8 (0,05 М трис-HCl) и выдерживали 2,5 ч при 56° С. Реакционную смесь анализировали обращенно-фазовой хроматографией на хроматографе «Милихром». Продукт реакции алкилирования тиосульфата имеет меньшую хроматографическую подвижность, чем исходный реагент, и хорошо отделяется от него при хроматографии. Во всех случаях реакция алкилирования тиосульфата протекала с почти количественными выходами (не ниже 95%).

*Хлорид 2-[(6-аминогексил)амино]-10-(2-оксиэтил)феназиния.* К 2 г гексаметилендиамина, растворенного в 5 мл абс. метанола, добавляли при перемешивании 1 г хлорида N-(2-оксиэтил)феназиния. Через 1 сут к реакционной смеси добавляли 10 мл эфира, выпавший осадок повторно переосаждали из метанола (5 мл) эфиром (10 мл). Получили 0,95 г (выход 66%) хлорида 2-[(6-аминогексил)амино]-10-(2-оксиэтил)феназиния, который далее был использован для получения соединения (Iв), $n = 6$ (см. ниже). Аналитический образец готовили переводом красителя из хлоридной соли в перхлоратную, добавляя к концентрированному водному раствору последнего 10% раствор $LiClO_4$ в воде (до 2-кратного молярного избытка перхлората) с последующей перекристаллизацией выпавшей соли из воды, т. пл. 123—125° С. ИК-спектр, $см^{-1}$: 770, 820 (=C—H); 1075, 1375 (C—O—H); 1510, 1560 (C=N); 1602 (C=C); 1625 ($NH_2$); 2860, 2920 ($—CH_2—$); 3060 (=C—H); 3190 ($—NH_2$); 3400 (—O—H). УФ-спектр, $\lambda_{max}$, нм ($\lg\varepsilon$): 237 (4,53), 295 (4,54), 380 (4,00), 394 (4,02), 530 (4,20). Спектр ПМР, δ, м. д. (DMSO-$d_6$): 7,94 (6H, м, аром. H), 6,83 (1H, с, аром. H), 5,10 (2H, т, $—CH_2—N$), 4,05 (2H, т, $—CH_2—O$), 3,58 (2H, м, $—CH_2—NH_2$), 2,81 (2H, м, $—CH_2—HN—Ar$), 1,45 (8H, м, $—(CH_2)_4—$). Найдено, %: C 53,7; H 6,15; N 12,0; Cl 7,94. $C_{20}H_{26}ClN_4O_5 \cdot {}^1/_2CO_3^{-2}$. Вычислено, %: C 53,7; H 6,20; N 11,9; Cl 8,08.

*Реакционноспособные алкилирующие производные олигонуклеотидов (VI)—(IX)* получали при 20—23° С по методике [12] и выделяли с выходом 30—90% обращенно-фазовой хроматографией (рис. 5). УФ-характеристики полученных соединений приведены в табл. 1.

*Введение полиметилендиаминов по 5′-концевому фосфату олигонуклеотидов и их производных (общая методика).* 0,2—0,5 мкмоль олигонуклеотида или его алкилирующего производного переводили в цетавлоновую соль, как описано ранее [12], сушили 3 ч в вакууме масляного насоса, растворяли вместе с 3,5 мг (13,5 мкмоль) $(Ph)_3P$, 3 мг (13 мкмоль) $(PyS)_2$ и 1,6 мг (13 мкмоль) DMAP в 30 мкл DMSO. Смесь выдерживали 10 мин при 20—23° С и добавляли 30 мкл 0,2 М раствора соответствующего полимети-

лендиамина в DMSO. Через 10 мин нуклеотидный материал осаждали 1,5 мл 2% раствора $LiClO_4$ в ацетоне, осадок отделяли и процедуру осаждения из воды (~60 мкл) повторяли трижды. Соединения (VIб)—(IXб), полученные по этой методике, использовали в синтезе производных (VIв)—(IXв) без дополнительной очистки. Соединения (Iб) ($n = 2—7$) выделяли хроматографией с выходом 80—90% (рис. 1, 2).

*Введение остатка феназиния в олигонуклеотиды и их алкилирующие производные (общая методика).* Олигонуклеотид или его алкилирующее производное (0,2—0,5 мкмоль), содержащее алифатическую аминогруппу, растворяли в 80 мкл свежеприготовленного 0,05 М раствора хлорида N-(2-оксиэтил)феназиния в 0,1 М $Na_2CO_3$, выдерживали 8—10 мин при 20—23° С и добавляли 1,5 мл 2% раствора $LiClO_4$ в ацетоне. Осадок отделяли, растворяли в воде (60—100 мкл) и процедуру осаждения повторяли 2—3 раза. Полученные этим методом соединения выделяли обращенно-фазовой хроматографией (рис. 3, 5) с выходом: (Iв) ($n = 2—7$) — 90%, (VIв)—(IXв) не ниже 70%. Электронный спектр поглощения для (Iв) ($n = 6$) приведен на рис. 4. Спектральные характеристики (Iв) ($n = 2—7$), (VIв)—(IXв) приведены в табл. 1.

*(Phn)NH(CH$_2$)$_6$NHpC-C-A-A-A-C-Ar («встречный» синтез).* Высушенный осадок цетавлоновой соли олигонуклеотида (I) (0,5 мкмоль) растворяли в 30 мкл DMSO вместе с 3,5 мг (13,5 мкмоль) $(Ph_3)P$, 3 мг (13,5 мкмоль) $(PyS)_2$ и 1,6 мг (13 мкмоль) DMAP, выдерживали 10 мин (20—23° С) и добавляли 2 мг (5 мкмоль) хлорида 2-[(6-аминогексил)амино]-10-(2-оксиэтил)феназиния. Через 40 мин нуклеотидный материал осаждали 1,5 мл 2% раствора $LiClO_4$ в ацетоне. Процедуру осаждения повторяли 3—4 раза и продукт реакции (Iв) ($n = 6$) выделяли обращенно-фазовой хроматографией с выходом 70%. Спектральные и хроматографические характеристики производного (Iв) ($n = 6$), полученного этим и вышеописанным методами, совпадают полностью.

*Молярный коэффициент поглощения олигодезоксирибонуклеотидов* определяли, измеряя прирост оптического поглощения растворов олигомеров (I)—(V) после полного гидролиза последних фосфодиэстеразой змеиного яда по методике [22].

*Молярный коэффициент поглощения производных олигодезоксирибонуклеотидов* — (Iв), (VI)—(IX) и (VIв) — (IXв) — определяли, используя метод радиоизотопной метки. В олигонуклеотиды (I)—(IV) (~0,5 мкмоль) вводили $^{32}$P-метку (~10—20 мкКи) на 5′-конец цепи по методу [15]. После выделения обращенно-фазовой хроматографией из части меченых олигонуклеотидов (I)—(IV) по вышеописанным методикам получали производные (VI)—(IX), (VIв)—(IXв) и (Iв) ($n = 2—7$), а оставшаяся их часть служила контролем. Все полученные меченые соединения и контрольные олигонуклеотиды растворяли в соответствующем буфере, записывали электронные спектры поглощения и равные аликвоты растворов ($7—40 \cdot 10^3$ имп/мин) с известным оптическим поглощением переносили в счетные баночки. После промера радиоактивности аликвот (в воде по Черенкову) рассчитывали величину $\varepsilon$ реагентов, исходя из ранее определенных $\varepsilon_{260}$ олигонуклеотидов (I)—(IV), по формуле

$$\varepsilon''_{260} = \varepsilon'_{260} \frac{A''R'}{R''A'},$$

где $A$ — оптическое поглощение аликвоты при $\lambda_{260}$, $R$ — радиоактивность аликвоты в имп/мин, штрихом обозначен исходный немодифицированный олигонуклеотид (I)—(IV), двумя штрихами — его производное.

Авторы благодарят акад. Д. Г. Кнорре за внимание и интерес к работе, Н. В. Булычева и С. Г. Лохова за помощь при плавлении комплементарных комплексов олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I.* Tetrahedron Lett., 1967, № 37, p. 3557—3562.
2. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С., Стефанович Л. Е.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1512—1522.
3. *Власов В. В., Годовиков А. А., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В.* Докл. АН СССР, 1984, т. 276, № 5, с. 1263—1265.
4. *Asseline V., Toulme F., Thuong N. T., Delarue M., Montenay-Garestier T., Helene C.* EMBO J., 1984, v. 3, № 4, p. 795—800.
5. *Asseline V., Delarue M., Laucelot G., Toulme F., Thuong N. T., Montenay-Garestier T., Helene C.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 11, p. 3297—3301.
6. *Letsinger R., Schott M. E.* J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 24, p. 7394—7396.
7. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 516—521.
8. *Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 23, p. 7368—7372.
9. *Yielding L. W., Yielding K. L., Donoghue J. E.* Biopolymers, 1984, v. 23, № 1, p. 83—110.
10. *Серебряный С. Б., Юфа П. А.* Укр. хим. журн., 1963, т. 29, вып. 3, с. 322—325.
11. *Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М.* Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 4, с. 475—481.
12. *Райт В. К., Карпова Г. Г., Гринева Н. И.* Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 1, с. 31—38.
13. *Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г.* Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук, 1970, № 4, вып. 2, с. 111—118.
14. *Барам Г. И., Грачев С. А.* Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1420—1422.
15. *Berkner K. L., Folk W. B.* J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 10, p. 3176.
16. *Шишкин Г. В.* Химия гетероцикл. соедин., 1984, № 10, с. 1407—1411.
17. А. с. 1153976 (СССР). Способ получения сорбента/Ястребов С. И. Заявл. 08.12.83. Опубл. в Б. И., 1985, № 17, с. 28.
18. *Бауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В.* Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 815—820.
19. *Горн В. В., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Пичко Н. П.* Докл. АН СССР, 1983, т. 270, № 3, с. 613—615.
20. *Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Левина А. С., Пичко Н. П., Подуст Л. М., Федорова О. С.* Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 2, с. 230—239.
21. *Maxam A. M., Gilbert W.* Meth. Enzymol., 1980, v. 65, p. 499—560.
22. *Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Drutsa V. L., Melnikova N. P., Purmal A. A.* Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 21, p. 5747—5761.

Поступила в редакцию
12.XII.1985

## MODIFICATION OF NUCLEIC ACIDS IN STABILIZED COMPLEMENTARY COMPLEXES. I. SYNTHESIS OF ALKYLATING DERIVATIVES OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES HAVING A 5′-TERMINAL N-(2-OXYETHYL)-PHENAZINIUM RESIDUE

ZARYTOVA V. F., KUTYAVIN I. V., SIL'NIKOV V. N., SHISHKIN G. V.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSS, Novosibirsk*

A method is developed for synthesizing reactive derivatives of oligonucleotides of a new type (Phn)NH$(CH_2)_2$NHp*N-N...N-rN*(RCl) having both alkylating 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylidene group (RCl) and N-(2-oxyethyl)phenazinium (Phn) residue. The procedure is based on the interaction of $Phn^+Cl^-$ with aliphatic amino group introduced at the 5′-terminal phosphate of oligodeoxyribonucleotide alkylating derivatives. The melting temperature of the complex formed by a complementary dodecanucleotide pA-A-C-C-T-G-T-T-T-G-G-C with the oligonucleotide derivative (Phn)NH$(CH_2)_n$NHpC-C-A-A-A-C-rA ($n$ = 2—7) is 13—19° higher than that of pC-C-A-A-A-C-rA itself.