



УДК 547.963.32.057 + 547.92

© 1990 г.

*В. Ф. Зарытова, Е. М. Иванова, М. Н. Часовских***СИНТЕЗ СТЕРОИДСОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ  
И ИХ АЛКИЛИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ***Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР*

Осуществлен синтез олигонуклеотидных производных, содержащих остаток стероида (холестерина, эргостерина, тестостерона), основанный на реакции стероида по гидроксигруппе с *n*-хлорфениловыми эфирами олигонуклеотида, с помощью 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорида и 1-метилимидазола. Показано, что введение остатка стероида в декатимидилаты практически не влияет на комплексообразующие свойства последних и существенно повышает их гидрофобность. Получены реакционноспособные производные олигонуклеотидов, содержащие одновременно остаток стероида и алкилирующую 4-(*N*-метил-*N*-2-хлорэтиламино)фенильную группировку.

Высокая специфичность взаимодействия нуклеиновых кислот с элементарными им олигонуклеотидами позволяет создавать методы направленного воздействия на генетический аппарат клетки [1—2]. Однако олигонуклеотиды природного строения и их алкилирующие производные обладают крайне низкой способностью связываться с клетками, что значительно снижает степень их воздействия на клеточные нуклеиновые кислоты [3]. Повышение гидрофобности олигонуклеотидов путем замены межнуклеотидных фосфодиэфирных групп на фосфотриэфирные или метилфосфонатные увеличивает степень их проникновения в клетки [3—5]. Мы предположили, что повысить гидрофобность олигонуклеотидов, а следовательно, и степень связывания их с клетками можно, не только уменьшая число зарядов на сахарофосфатном остове олигонуклеотида, но и вводя в его структуру гидрофобные группировки, имеющие, например, стероидную природу: остатки холестерина, стероидных гормонов и их предшественников.

Данная работа посвящена синтезу стероидсодержащих декатимидилатов и их алкилирующих производных.

Поскольку холестерин и ряд других стероидов содержат гидроксигруппу, представляется возможным вводить их в олигонуклеотид посредством образования фосфоэфирной связи. Использование условий гомогенного фосфотриэфирного синтеза олигонуклеотидов [6] при этом позволит получать олигонуклеотиды, содержащие остаток стероида как по 5'-, так и по 3'-концевому фосфату, в количестве, достаточном для проведения биохимических исследований. Чтобы выяснить возможность получения стероидсодержащих олигонуклеотидов, необходимо исследовать взаимодействие стероида с *n*-хлорфениловым эфиром олигонуклеотида, а также устойчивость стероидного остатка в процессе деблокирования и выделения олигонуклеотидного производного.

Использованы обозначения, рекомендованные номенклатурной комиссией IUPAC — IUB, но префикс «d» в обозначении олигонуклеотидов опущен. ChS — холестерин, ES — эргостерин, TS — тестостерон, TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид, Melm — 1-метилимидазол, R'Cl — 4-(*N*-метил-*N*-2-хлорэтиламино)фенильный остаток,  $\beta$  — *n*-хлорфениловый эфир концевого или межнуклеотидного фосфата,  $\beta$  — 2-цианэтил *n*-хлорфениловый диэфир концевого фосфата, TBAF — тетрабутиламонийфторид, Lev — левуленильная защитная группа.

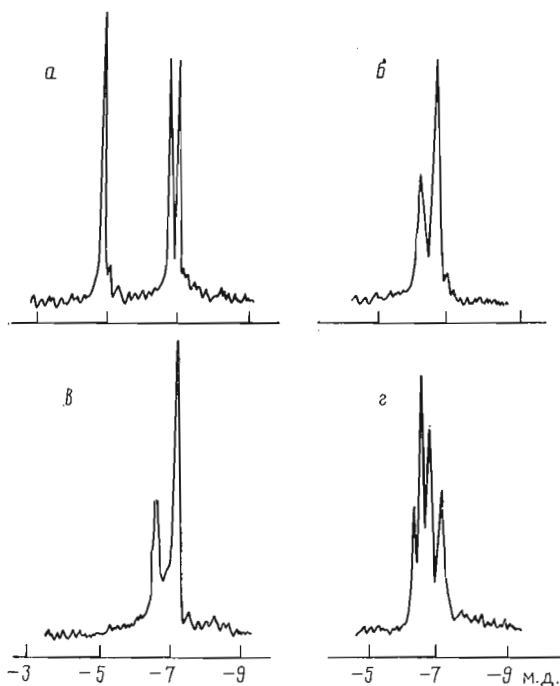


Рис. 1

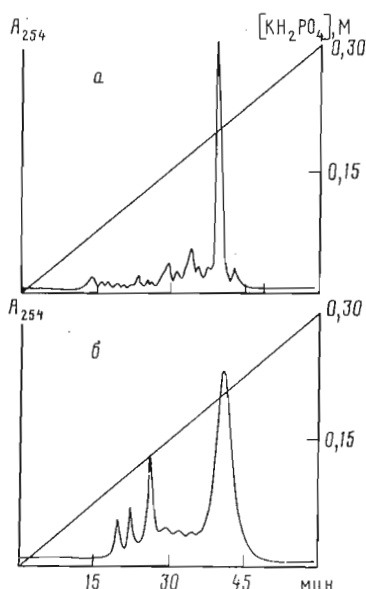
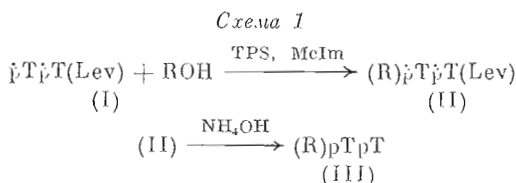


Рис. 2

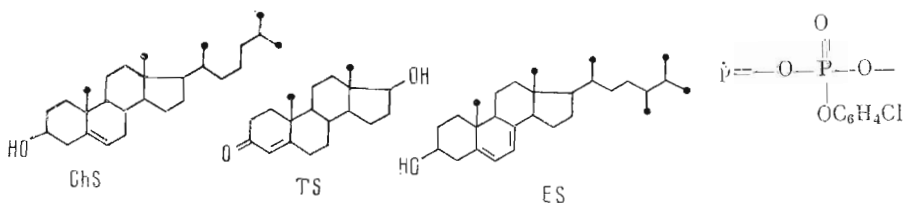
Рис. 1. Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР в хлороформе: а —  $\text{pTpT(Lev)}$ , б —  $(\text{ES})\text{pTpT(Lev)}$ , в —  $(\text{ChS})\text{pTpT(Lev)}$ , г —  $(\text{TS})\text{pTpT(Lev)}$

Рис. 2. Ионообменная хроматография  $\text{pT}_3\text{U}$  (а) и  $(\text{ChS})\text{pT}_3\text{U}$  (б) на колонке  $(1,5 \times 30 \text{ см})$  с Полисил СА ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) в градиенте концентрации  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  при рН 6,5 в 30% ацетонитриле

С этой целью был проведен синтез производных дитимидилатов, содержащих остатки холестерина (ChS), эргостерина (ES) и тестостерона (TS):



где ROM:



За ходом реакции следили с помощью  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии. На рис. 1 приведены спектры исходного *n*-хлорфенилового эфира дитимидилата (I) и соединений (II), полученных в результате взаимодействия эфира (I) с холестерином, эргостерином и тестостероном в присутствии смеси 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорида (TPS) и 1-метилимидазола (MeIm). В спектре исходного дитимидилата (I) регистрируются сигналы концевых диэфирного ( $\delta = -5,1$  м. д.) и межнуклеотидного триэфирного ( $\delta = -7,3$  м. д.) фосфатов. Наличие двух сигналов в области  $-7,3$  м. д. обусловлено существованием межнуклеотидной триэфирной фосфатной группировки в виде смеси двух диастереомеров [7]. В спектрах образующихся соединений (II) регистрируются только сигналы в области резонан-

са триэфирного фосфора ( $\delta = -7,3$  м. д.), что свидетельствует о присоединении стероида по 5'-концевому фосфату дитимидилата (I) посредством образования фосфоэфирной связи.

Аналогично были получены дитимидилаты, содержащие остаток цитостерина, стигмастерина, нортестостерона (данные не приведены).

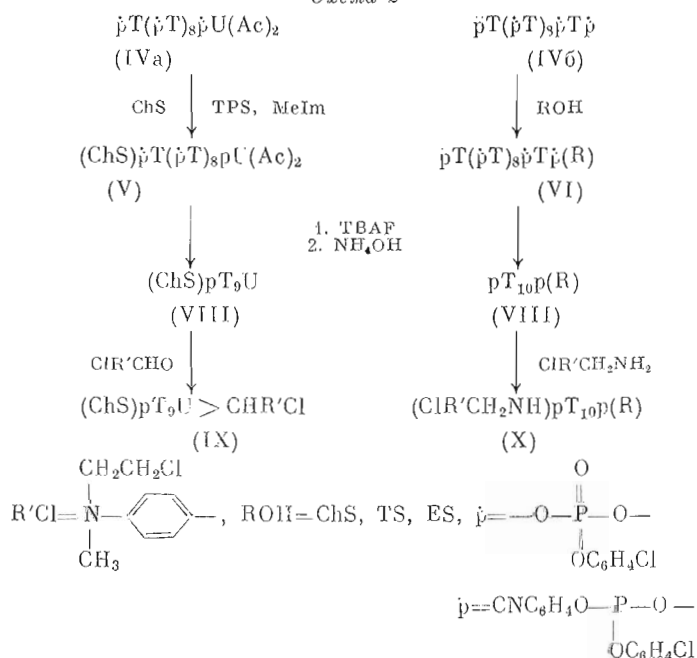
Полностью блокированные стероидсодержащие дитимидилаты (II) после их выделения хроматографией на силикагеле обрабатывали концентрированным аммиаком для удаления защитных групп. Стероидная группировка в составе дитимидилатов (III) придает им исключительную гидрофобность, они практически полностью сорбируются как на ионообменных, так и на обращенно-фазовых носителях, обычно применяемых для выделения олигонуклеотидов и их производных. Поэтому выделить деблокированные стероидсодержащие дитимидилаты (III) удалось только хроматографией на силикагеле при использовании в качестве элюента 10% раствора хлороформа в этаноле.

Стероидсодержащие дитимидилаты (III) были охарактеризованы методом ПМР. В спектрах наряду с сигналами протонов тиминов регистрируются сигналы протонов метильных групп стероидов.

Совокупность полученных данных свидетельствует об образовании ковалентной фосфоэфирной связи между остатком стероида и концевым фосфатом динуклеотида и об устойчивости ее в условиях деблокирования триэфирных защищенных олигонуклеотидов. С учетом этих результатов был проведен синтез стероидсодержащих декануклеотидов и их алкилирующих производных.

Для получения алкилирующих производных олигонуклеотидов алкилирующую 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)фенильную группировку вводят обычно либо по 3'-концевому рибозвену, либо по 5'-концевому фосфату олигонуклеотида [1]. Поэтому был осуществлен синтез как 5'-холестеринового эфира нонатимидилилуридина со свободной 2', 3'-*цис*-диольной группировкой, так и 3'-стероидсодержащих декатимидилатов со свободной 5'-фосфатной группой (схема 2).

Схема 2



Для получения 5'-холестеринового эфира олигонуклеотида защищенный декануклеотид, синтезированный фосфотриэфирным методом в растворе с последующим удалением 5'-концевой 2-цианэтильной группы (IVa) [8], вводили в реакцию с холестерином.

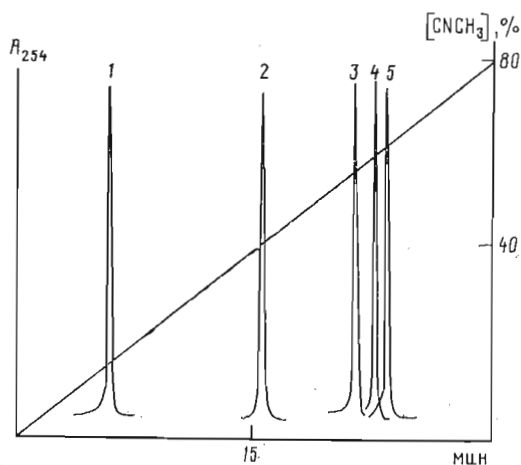


Рис. 3

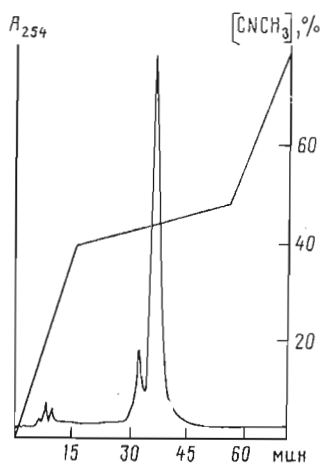


Рис. 4

Рис. 3. Обращенно-фазовая хроматография  $pT_{10}$  (1) и его стероидных производных  $pT_{10}p(TS)$  (2),  $pT_{10}p(ES)$  (3),  $pT_{10}p(ChS)$  (4) и  $(ChS)pT_9U$  (5) на колонке ( $0,7 \times 30$  см) с Lichrosorb RP-18 в градиенте концентрации ацетонитрила в  $0,05$  M  $LiClO_4$

Рис. 4. Обращенно-фазовая хроматография реакционной смеси, полученной при синтезе  $(ChS)pT_9U > CHR'Cl$  на колонке ( $0,7 \times 30$  см) с Lichrosorb RP-18 в градиенте концентрации ацетонитрила в  $0,05$  M  $LiClO_4$

В случае получения 3'-стероидсодержащих олигонуклеотидов защищенный декатимидилат деблокировали по 3'-ОН-группе [9] и фосфорилировали *n*-хлорфенилдихлорфосфатом в присутствии триазола [10] с образованием олигонуклеотидного блока (IVб), имеющего на 5'-конце цепи триэфирную, а на 3'-конце — диэфирную фосфатные группы, который также вводили в реакцию со стероидом.

Время конденсации во всех случаях составляло 15—25 мин, выход целевых продуктов (V) или (VI) после хроматографии на силикагеле — 80—95 %.

Деблокированные стероидсодержащие олигонуклеотиды (VII) и (VIII) выделяли ионообменной и обращенно-фазовой хроматографиями. Влияние стероидных групп в составе декануклеотида на подвижность его при ионообменной хроматографии (в отличие от динуклеотидов) практически не проявляется (рис. 2). В то же время, как видно из профилей обращенно-фазовых хроматографий (рис. 3), декануклеотиды, содержащие остаток стероида, выходят при значительно большем содержании ацетонитрила в элюенте (40—60 %), чем контрольный декатимидилат (20 %), что свидетельствует о повышенной гидрофобности стероидсодержащих декануклеотидов.

Синтез 4-(*N*-метил-*N*-2-хлорэтиламино)бензильденового производного 5'-холестеринового эфира нонатимидилуридина (IX) осуществляли аналогично данным работы [11].

Алкилирующее 4-(*N*-метил-*N*-2-хлорэтиламино)бензиламидное производное 3'-стероидсодержащих декатимидилатов (X) получали, обрабатывая олигонуклеотид (VIII) смесью трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида в присутствии 1-метилимидазола или 4-*N,N*-диметиламинопиридина с последующим добавлением в реакционную смесь амина  $NH_2CH_2R'Cl$  [12].

Алкилирующие производные (IX) и (X) после осаждения их из реакционной смеси 2% раствором  $LiClO_4$  в ацетоне выделяли обращенно-фазовой хроматографией (рис. 4) и анализировали содержание активного хлора. Выход соединений (IX) и (X) составлял 70—90 %.

Влияние остатков стероида в олигонуклеотидах на их комплексообразующие свойства оценивали, определяя температуру плавления комплексов, образованных гексадекаденилатом и стероидсодержащим декануклеотидом (таблица).

**Температура плавления комплексов  $pA_{16}$  со стероидсодержащими олиготимидилатами**

Тимидилаты	$pT_{10}$	$pT_{10}P$ (ES)	$pT_{10}P$ (TS)	$pT_{10}P$ (ChS)	(ChS) $pT_5U$
Т. пл., °С	32	29	30	29	35

Введение гидрофобной группировки на 3'-конец декатимидилата лишь незначительно дестабилизирует комплементарный комплекс (температура плавления понижается на 2—3° С), а введение холестерина на 5'-конец нонатимидилилуридина приводит даже к некоторой стабилизации комплекса: температура плавления повышается на 3° С.

Полученные данные позволяют заключить, что наличие остатка стероида в составе олигонуклеотида при длине по крайней мере не менее 10 мономеров практически не влияет на его комплексообразующие свойства.

Таким образом, нами проведен синтез стероидсодержащих олигонуклеотидов и их алкилирующих производных, обладающих повышенной гидрофобностью и удовлетворяющих основному требованию, предъявляемому к сайтспецифичным реагентам, — способности образовывать комплексы с комплементарными им олигонуклеотидами. Результаты по эффективности проникновения в клетки стероидсодержащих алкилирующих производных олигонуклеотидов и модификации ими биополимеров будут опубликованы отдельно.

### Экспериментальная часть

В работе использовали *n*-хлорфениловые, 2-цианэтиловые эфиры дитимидилатов (НИБХ СО АН СССР), 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид (ОХП НИОХ СО АН СССР), 1-метилимидазол (Ega, ФРГ), холестерин, эргостерин, тестостерон, 2,2'-дипиридилдисульфид, трифенилфосфин (Fluka AG, Швейцария), 4-(*N*-метил-*N*-2-хлорэтиламино)бензальдегид и 4-(*N*-метил-*N*-2-хлорэтиламино)бензиламин (НИБХ СО АН СССР), олигонуклеотиды  $pT$  ( $pT$ )<sub>8</sub>  $pU$  (Ac)<sub>2</sub> и  $pT$  ( $pT$ )  $pT_8$  (Lev), полученные триэфирным блочным методом в растворе, как описано в работе [6].

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ).

Полностью защищенные олигонуклеотиды выделяли с помощью хроматографии на силикагеле Kieselgel 60 (Merck, ФРГ).

Деблокированные олигонуклеотиды и их производные выделяли с помощью ионообменной и обращенно-фазовой хроматографий на жидкостных хроматографах Altex-232 и Waters-510 (США) на колонках с носителями «Полисил СА» [13] и Lichrosorb RP C-18 (Merck, ФРГ).

Кривые плавления комплементарных комплексов (0,16 М NaCl, 0,02 М  $NaH_2PO_4$ , 0,1 мМ EDTA, рН 7,4, при концентрации олигонуклеотидов  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М) регистрировали с помощью установки для исследования термической денатурации в ультрамикромасштабе, созданной в НИБХ СО АН СССР на базе спектрофотометра «Обь-4».

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР записывали на импульсном спектрометре AM-400 (Bruker Physic AG, ФРГ) на частоте 400 МГц, спектры <sup>31</sup>P-ЯМР — на импульсном спектрометре НХ-90 (Bruker Physic AG, ФРГ) на частоте 36,4 МГц. Отнесение сигналов соединений проводили с использованием значений их химических сдвигов в миллионных долях относительно 85% фосфорной кислоты.

(*R*) $pT$  $pT$ (*Lev*) (*R* = ChS, TS, ES) (II). Навески дитимидилата  $pT$  $pT$ (*Lev*) (I) (0,12 ммоль), стероида (0,24 ммоль), ТРС (0,36 ммоль) выдерживали в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, растворяли в 1,2 мл абсолютного хлороформа, добавляли MeIm (0,72 ммоль) и выдерживали 20 мин при 20° С. За ходом реакции следили с помощью ТСХ в системе хлороформ — метанол, 9 : 1. Продукты реакции выделяли на колонке с силикагелем (150 мл) в градиенте концентрации этанола в хлороформе (0—15%, 600 мл). Выход

продуктов реакции после осаждения гексаном из хлороформа составлял 90—95%.

(R)pTpT (R = ChS, TS, ES) (III) получали обработкой стероидсодержащего дитимидилата (II) конц. аммиаком (25%) в течение 1 сут при 20° С. Выделение проводили хроматографией на силикагеле (150 мл), используя в качестве элюента 10% раствор хлороформа в этаноле.

В спектрах ПМР полученных соединений (III) регистрируются сигналы протонов тими́на — 7,71 (с, 1, Н6) и 7,76 (с, 1, Н6'), 1,89 (д, 3, СН<sub>3</sub>) и 1,91 (д, 3, СН<sub>3</sub>') [14] и метильных групп стероида: в случае (ES)pTpT в области 0,65—1,05 (м, 18H) и в случае (TS) pTpT — 0,80—1,35 (м, 6H) [15].

(ChS) pT(pT)<sub>8</sub> pU(Ac)<sub>2</sub>(V), pT(pT)<sub>8</sub> pTp(R) (R = ChS, ES, TS) (VI). Навески триэфирного олигонуклеотидного блока, стероида и TPS в соотношении 1 : 2 : 3 выдерживали в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, растворяли в абсолютном хлороформе или пиридине (0,1 М раствор олигонуклеотида), добавляли MeIm (2-кратный избыток по отношению к TPS). За ходом реакции следили с помощью ТСХ в системе хлороформ — метанол, 8,5 : 1,5. Через 15—25 мин реакционную смесь наносили на колонку с силикагелем (150 мл) и хроматографировали в градиенте концентрации этанола в хлороформе (0—15%, 600 мл). Выход целевых продуктов (V, VI) составлял 85—95% после осаждения гексаном из хлороформа.

(ChS)pT<sub>9</sub>U (VII), pT<sub>10</sub>p(R) (VIII) (R = ChS, TS, ES) получали, обрабатывая производные олигонуклеотидов (V) и (VI) 0,3 М раствором тетрабутиламмонийфторида в 50% водном растворе пиридина в течение 16 ч и конц. аммиаком (25%) в течение 24 ч при 20° С [16].

(ChS)pT<sub>9</sub>U > CHR'Cl(IX) получали по методике, предложенной для синтеза алкилирующих бензилиденовых производных олигонуклеотидов [11], обрабатывая 20—50 ОЕ<sub>260</sub>(ChS)pT<sub>9</sub>U (VII) в диметилформамиде при —70° С 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензальдегидом (0,9 М) в присутствии трифторуксусной кислоты (2,7 М) и 2,2-диметоксипропана (1,1 М). Реакционную смесь выдерживали 45 мин при 20° С, нейтрализовали триэтиламином при —70° С и осаждали 2% раствором LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. Продукт реакции выделяли обращенно-фазовой хроматографией в градиенте концентрации ацетонитрила (0—80%) в 0,05 М растворе LiClO<sub>4</sub>. Выход после хроматографии составлял 70—90%.

(ClR'CH<sub>2</sub>NH)pT<sub>10</sub>p(R) (R = ChS, TS, ES) (X) получали по методике, предложенной для введения аминов по концевому фосфату олигонуклеотида [12], обрабатывая 5 ОЕ<sub>260</sub> стероидсодержащего декатимидилата (VIII) в 50 мкл смеси трифенилфосфина (0,3 М) дипиридилдисульфида (0,3 М) и 4-N,N-диметиламинопиридина или MeIm (0,6 М) в диметилформамиде в течение 10 мин при 20° С, после чего добавляли ClR'CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (см. схему 2) до концентрации 0,6 М. Через 20 мин олигонуклеотидный материал осаждали 2% раствором LiClO<sub>4</sub> в ацетоне и продукт реакции выделяли обращенно-фазовой хроматографией в градиенте концентрации ацетонитрила (0—80%) в 0,05 М растворе LiClO<sub>4</sub>. Выход 70—90%.

Реакционная способность к алкилированию производных (IX) и (X), определенная по реакции с тиосульфатом [17], составляла 85—90%.

Авторы благодарят С. Г. Лохова и Т. В. Мальцеву за помощь при плавлении комплекментарных комплексов олигонуклеотидов и запись и анализ спектров ПМР.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D. G., Vlassov V. V. // Affinity modification of biopolymers. CRPress. Boca Ration, 1988.
2. Jessus C., Cazenave C., Ozon R., Helene C. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 5. P. 2225—2233.
3. Abramova T. V., Vlassov V. V., Lebedev A. V., Rait A. S. // FEBS Lett. 1988. V. 236. № 1. P. 235—245.
4. Зарьтова В. Ф., Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С., Стефанович Л. Е. // Биоорганич. химия. 1981. Т. 7. № 10. С. 1512—1522.
5. Miller P. S., Agris C. H., Aurelian L., Blake K. P., Murakami A., Reddy M., Spits S., Ts'О P. O. P. // Biochemie. 1985. V. 67. P. 769—776.
6. Зарьтова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 516—521.

7. Лебедев А. В., Резвулин А. И. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1975. № 4. С. 149—151.
8. Gait M. J., Porov S. G., Singh M., Titmas R. C. // Nucl. Acids Res. Symposium series. 1980. № 7. P. 243—257.
9. Van Voort J. H., Burgers P. M. J. // Tetrahedron Lett. 1976. № 52. P. 4875—4878.
10. Добрынин В. Н., Быстров Н. С., Чернов Б. К., Северцева И. В., Колосов М. Н. // Биоорганич. химия. 1979. Т. 5. № 8. С. 1254—1256.
11. Райт В. К., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. // Биоорганич. химия. 1977. Т. 3. № 1. С. 31—38.
12. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475—481.
13. Ястребов С. И., Попов С. Г. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 661—669.
14. Kan L. S., Cheng D. M., Miller P. S., Jano J., Ts' O P. O. P. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 10. P. 2122—2132.
15. The Sadtler standard spectra. Nuclea magnetic resonance spectra. Philadelphia. Sadtler reseach lab.
16. Бауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 815—820.
17. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 914—920.

Поступила в редакцию  
13.I.1989  
После доработки  
12.X.1989

V. F. ZARYTOVA, E. M. IVANOVA, M. N. CHASOVSKIKH

### SYNTHESIS AND PROPERTIES OF OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES CONTAINING STEROID GROUPS

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry,  
Siberian Division, Academy of Sciences of the USSR*

New alkylating derivatives of oligonucleotides carrying a steroid (cholesterol, testosterone or ergosterol) residue have been synthesized, the residue being introduced via its hydroxyl group into the triester oligonucleotide block in the presence of triisopropylbenzenesulphonyl chloride and N-methylimidazole. Covalent attachment of steroids to oligonucleotides increases their hydrophobicity and does not influence the melting temperature of their complementary complexes. The data obtained showed that the oligonucleotide derivatives, bearing both an alkylating group of nitrogen mustard and a steroid residue, can be used as reagents for specific modification of nucleic acids.