

5. *Georgioui S., Thompson M., Mukhopadhyay A. K.* Melittin-phospholipid interaction studied by employing the single tryptophan residue as an intrinsic fluorescent probe // *Biochim. et biophys. acta.*—1982.—688, N 2.— P. 441—452.
6. *Камалов В. Ф., Ладохин А. С., Толугаев Б. Н.* Наносекундная внутримолекулярная динамика мелиттина // Докл. АН СССР.—1987.—296, № 3.— С. 742—745.
7. *Ладохин О. С., Костржевська О. Г., Демченко О. П.* Взаємодія меліттину з фосфоліпідним бішаром. «Поверхнева» і «внутрішня» форми білка // Доп. АН УРСР.—1988.— № 11.— С. 65—68.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев
МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 20.06.88

УДК 577.113.4

МЕТИЛФОСФОНАТНЫЕ АЛКИЛИРУЮЩИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОКТАТИМИДИЛАТА

Н. В. Амиранов, В. Ф. Зарытова

Серьезным недостатком олигонуклеотидов с природной фосфодиэфирной связью и их реакционноспособных производных, используемых для направленного воздействия на генетический аппарат клетки [1, 2], является их плохое проникновение через цитоплазматические мембраны и подверженность гидролизу клеточными нуклеазами [3]. Более перспективным с этой точки зрения является использование неионных аналогов олигонуклеотидов, особенно метилфосфонатных [3—9]. Однако реакционноспособные производные последних не были получены и их свойства не исследовались. Поскольку введение метилфосфонатных группировок в олигонуклеотид приводит к образованию смеси диастереомеров, способных образовывать комплементарные комплексы различной стабильности [7, 8], то изучение влияния таких группировок на реакционную способность аналогов необходимо проводить на индивидуальных изомерах. Из реакционноспособных аналогов олигонуклеотидов наиболее широко изучены алкилирующие, содержащие остаток 4-[(N-2-хлорэтил, N-метил)амино]бензиламина (C1RCH₂NH-), производные.

Целью данной работы было получение индивидуальных диастереомеров алкилирующих (содержащих C1RCH₂NH-остаток) производных октатимидилата, включающих три чередующиеся метилфосфонатные группировки, и исследование свойств полученных аналогов.

Нами были получены пять октатимидилатных производных: (Tr)₈R₁ (I); Tr(TrTr)₃TrR₁ (II); Tr(TrTr')₃TrR₁ (III); Tr(TrTr'')₃TrR₁ (IV) и Tr(Tr)₆TrR₁ (V) (где R₁ = а) — SCH₃, б) — OH, в) — NHCH₂RCI; р — фосфодиэфирный остаток, р' — метилфосфонатный остаток), исходя из полностью защищенных динуклеотидов: (MeO)₂TrTr(SCH₃)Tr(SCH₃, CNEt) (VI), (MeO)₂TrTr(CH₃)Tr(SCH₃, CNEt) (VII), (MeO)₂TrTr'(CH₃)Tr(SCH₃, CNEt) (VIIa), (MeO)₂TrTr''(CH₃)Tr(SCH₃, CNEt) (VIIб), (MeO)₂TrTr(SCH₃)Tr(CH₃, CNEt) (VIII) и (MeO)₂TrTr(CH₃)Tr(CH₃, CNEt) (IX). Динуклеотиды были синтезированы по обычной триэфирной схеме [10] с использованием в качестве конденсирующего реагента смеси TPS (0,3 M) и MeIm (0,6 M) в абсолютном пиридине (20 °С, 30—60 мин) при 0,1 M концентрациях нуклеозидного и нуклеотидного компонентов. Полученные динуклеотиды выделены хроматографией на силикагеле. Динуклеотид (VII), содержащий два асимметричных атома фосфора и соответственно четыре изомера с помощью препаративной силикагелевой хроматографии разделяли на два продукта, которые обозначены как р' ((VIIa), R_{(MeO)₂TrTr} = 0,82; ³¹P-ЯМР; б = 32,2; 30,2; 30,0 м. д.) и р'' ((VIIб), R_{(MeO)₂TrTr} = 0,72;

Сокращения: (MeO)₂Tr — *n*, *n*'-диметокситритил; CNEt — 2-цианэтил; TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид; MeIm — N-метилимидазол; TEA — триэтиламин; (PyS)₂ — 2,2'-дипиридилдисульфид; RCI — C₆H₄N-(CH₃)CH₂CH₂Cl; р' и р'' — энантиомерные конфигурации заместителей при атоме фосфора (см. в тексте). Символ d в обозначениях нуклеотидов опущен, так как использовались только нуклеотиды дезоксирида.

³²P-ЯМР; б=32,8; 30,4; 30,2 м. д.) изомеры; R_T—ТСХ на силикагеле в системе этанол—хлороформ (1:6). Сигналы с химическим сдвигом 32,2 и 32,8 м. д. отнесены к атому фосфора, содержащему метилфосфонатный остаток [5]. Методом встречного синтеза (VIIa) и (VIIб), используя фосфорилирование ранее описанных соответственно р'- и р''-изомеров (MeO)₂TrTr(CH₃)Т [7], были соотнесены изомеры динуклеотида (VII) с изомерами динуклеозидметилфосфоната (MeO)₂TrTr(CH₃)Т.

Исходя из р'- и р''-изомеров динуклеотида (VII), синтезированы индивидуальные диастереомеры олигонуклеотида (II) по схеме. Так же были получены все окта-

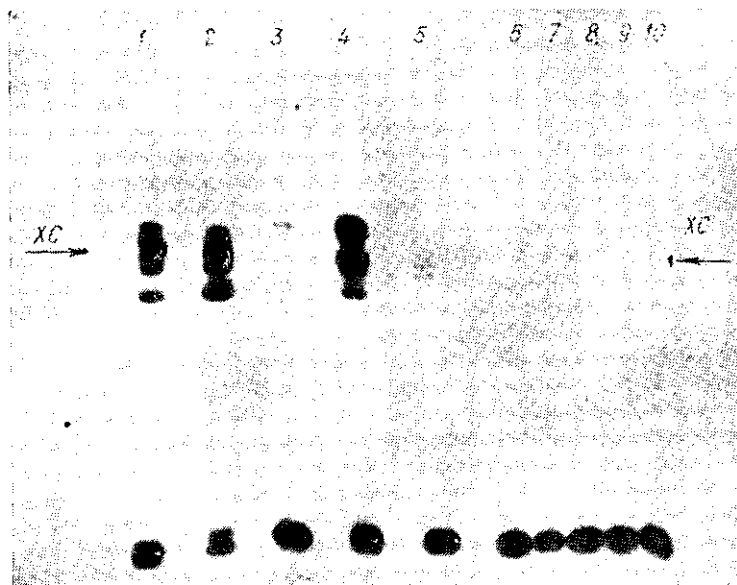
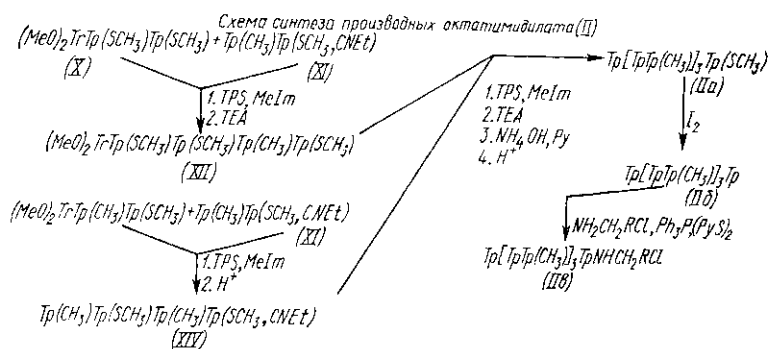


Рис. 1. Электрофорез в 20 %-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины, продуктов алкилирования 5'-³²P-меченного октадекадезоксинуклеотида pC₅A₃C₅ (XVa) реагентами (Ib) — (Vb): 1—5 — соответственно реакционные смеси (XVa) + (IIb); (XVa) + (IIIb); (XVa) + (IVb); (XVa) + (Ib); (XVa) + (Vb); 6—10 — соответственно контрольные смеси (XVa) + (IIa); (XVa) + (IIIa); (XVa) + (IVa); (XVa) + (Ia); (XVa) + (Va). Реакционные смеси исходно содержали нуклеотид-мишень в концентрации 1·10⁻⁵ М, реагент — 2·10⁻⁵ М в 0,01 М трис-НСl-буфере, рН 7,4, содержащем 0,2 М NaCl и 0,01 М MgCl₂. Анализ проводили по завершении реакции (64 ч, 20 °С)

Fig. 1. Separation of products of the (Ib)-(Vb) reagents alkylation of 5'-³²P-labelled octadecadeoxynucleotide pC₅A₃C₅ (XVa) as estimated from electrophoresis in 20% polyacrylamide gel containing 7 M urea after the reaction completion (64 h, 20 °C). Initial concentrations of nucleotide-target and reagent were equal to 1×10⁻⁵ M and 2×10⁻⁵ M, respectively, in 0.01 M of tris-HCl-buffer, pH 7.4, containing 0.2 M NaCl and 0.01 M MgCl₂: 1-5 — reaction mixtures (XVa) + (IIb), (XVa) + (IIIb), (XVa) + (IVb) and (XVa) + (Ib) and (XVa) + (Vb); 6-10 — the control mixture (XVa) + (IIa), (XVa) + (IIIa), (XVa) + (IVa), (XVa) + (Ia) and (XVa) + (Va), respectively

тимидилатные производные (I) — (V), SMe-остаток которых удаляли обработкой олигонуклеотида иодом [11]. Подробно синтез этих соединений будет опубликован позже.



Полученные метилфосфонатные производные октатимидилатов с 3'-концевым фосфатом (Iб) — (Vб) были использованы для синтеза 3'-фосфамидных алкилирующих реагентов (Iв) — (Vв) путем конденсации олигонуклеотида и 4-[(N-2-хлорэтил, N-метил)амино]бензиламина в присутствии трифенилфосфина, дипиридилдисульфида и MeIm аналогично работе [12]. Выходы реагентов составляли 80—90%. Реакционную способность к алкилированию полученных производных олиготимидилатов (Iв) — (Vв) проверяли по реакции с тиосульфатом [13]. Реакция алкилирования тиосульфата протекала во всех случаях с почти количественным выходом (не ниже 95%).

Далее были определены температуры плавления производных олигонуклеотидов (Iа) — (Vа) в комплексе с октадекадезоксинуклеотидом $(Cp)_5-(Ap)_8(Cp)_4C$ (XV) и

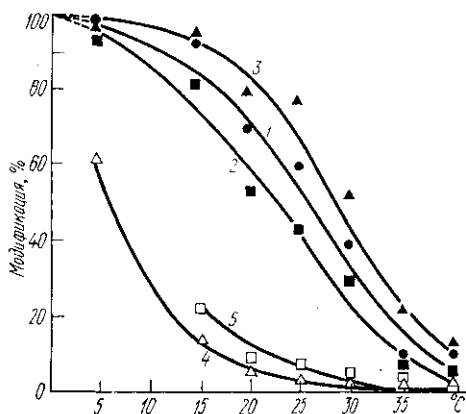


Рис. 2. Зависимость предельной степени модификации от температурного режима реакции при алкилировании октадекадезоксинуклеотида $5'-^{32}P-pC_5A_8C_5$ реагентами (Iв) — (Vв) (соответственно кривые 1—5). Условия проведения реакции см. в подлисе к рис. 1

Fig. 2. Dependence of maximal modification on temperature of alkylation of $5'-^{32}P-pC_5A_8C_5$ by (Ib)-(Vb) reagents. (Curves 1-5, respectively). The reaction conditions see in Legends of Fig. 1

составлена реакционная способность полученных реагентов (Iв) — (Vв) при их модификации меченой $5'-^{32}P$ матрицы-мишени (XV). Температуры плавления комплексов (XV) + (Iа), (XV) + (IIа), (XV) + (IIIа), (XV) + (IVа) и (XV) + (Vа) составляли соответственно 15; 12; 20; <3 и 8°C (концентрация комплексов — $1 \cdot 10^{-5}$ М в буфере, содержащем 0,2 М NaCl, 0,01 М MgCl₂, 0,01 М трис-HCl, pH 7,4 [14]). Реакции алкилирования в комплексе проводили при температурах 5; 15; 20; 25; 30; 35 и 40°C в течение пяти периодов времени полупревращения $C1RCH_2NH$ -фрагмента в гидролизованый водой продукт [13]. Полученные пробы после алкилирования подвергались анализу электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ). После радиоавтографии (рис. 1) полосы, содержащие исходную матрицу и участок геля выше исходной матрицы, вырезались и подвергались [^{32}P] счёту на счетчике в толуольном сцинтилляторе. По соотношению количества метки в обоих участках геля определяли максимальную степень модификации матрицы в комплексе. Выявлено, что предельная степень модификации всеми реагентами (Iв) — (Vв) снижается с ростом температуры и что для реагента (IIIв) она в интервалах температур 20–35°C максимальна (рис. 2). Так, например, при 20°C предельная алкилирующая способность реагентов (Iв) — (Vв) соответственно составляет 68, 49, 78, 5 и 6% суммарного количества модифицированной и немодифицированной матриц.

Таким образом, нами получены новые производные метилфосфонатных аналогов олигонуклеотидов, обладающие алкилирующей способностью по отношению к нуклеиновым кислотам и показана их различная реакционная способность в зависимости от стерического расположения метилфосфонатных групп в олигонуклеотиде. Показано также, что алкилирующие производные на основе р'-диастереомерного метилфосфонатного олиготимидилата в интервалах температур 20—35°C обладают большей предельной степенью алкилирования, чем р''-изомерный и дизфирный аналоги олиготимидилата.

Авторы выражают благодарность В. В. Горну за синтезированный и предоставленный октадекадезоксинуклеотид (XV), С. Г. Лохову — за помощь при измерениях температур плавления комплексов, а также И. В. Кутявину — за полезные советы.

OCTATHYMIDYLATE METHYLPHOSPHONATE ALKYLATING DERIVATIVES

N. V. Amirkhanov, V. F. Zarytova

Institute of Bioorganic Chemistry,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Summary

A series of novel derivatives of the oligonucleotide methylphosphonate analogues which alkylate nucleic acids have been synthesized. The following octathymidylate analogues containing 4-[(N-2-chloroethyl, N-methyl)amino]benzylamine residue (CIRCH₂NH—) at 3'-termin were obtained: (I) — (Tp)₈NHCH₂RCl — phosphodiester oligonucleotide derivative, (II) — Tp[TpTp'(CH₃)₃TpNHCH₂RCl and (III) — Tp[TpTp''(GH₃)₃TpNHCH₂RCl — two individual diastereomer derivatives (p' and p'') with alternating methylphosphonate and phosphodiester groups, (IV) — Tp[TpTp(CH₃)₃NHCH₂RCl — a mixture of diastereomers containing three methylphosphonate groups, (V) — Tp[Tp(CH₃)₆TpNHCH₂RCl — a mixture of diastereomers containing six methylphosphonate groups. Complementary target 5' [³²P]dpC₅A₈C₅ is alkylated by the reagents (I)–(V) at 5°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35°, and 40° C. It is shown that derivative (II) is the most effective alkylating reagent within the range of 20–35° C.

1. *Подавление синтеза иммуноглобулина в клетках миеломы МОРС-21 алкилирующими производными олигонуклеотида, комплементарного мРНК, кодирующей легкую цепь иммуноглобулина* / В. В. Власов, А. А. Годовиков, В. Ф. Зарытова и др. // Докл. АН СССР.— 1984.—274, № 5.— С. 1263—1265.
2. *Комплементарно адресованное алкилирование poly(A)-фрагментов мРНК в клетках асцитной карциномы Кребса* / В. Ф. Зарытова, Е. М. Иванова, Г. Г. Карпова и др. // Биоорг. химия.— 1981.—7, № 10.— С. 1512—1522.
3. *Miller P. S., Braiterman L. T., Ts'O P. O. P. Effects of a trinucleotide ethyl phosphotriester G^mp(Et)G^mp(Et)U on mammalian cell in culture* // Biochemistry.— 1977.—16, N 9.— P. 1988—1996.
4. *Agarwal K. L., Reftina F. Synthesis and enzymatic properties of deoxyribooligonucleotides containing methyl and phenylphosphonate linkages* // Nucl. Acids Res.— 1979.—6, N 9.— P. 3009—3024.
5. *Synthesis of nucleic acid methylphosphonates via the 1-hydroxybenzotriazole phosphotriester approach* / J. E. Marugg, E. de Vroom, C. E. Dreef et al. // Ibid.— 1986.—14, N 5.— P. 2171—2185.
6. *Inhibition of vesicular stomatitis virus protein synthesis and infection by sequence-specific oligodeoxyribonucleotide methylphosphonates* / C. H. Agris, K. R. Blake, P. S. Miller et al. // Biochemistry.— 1986.—25, N 20.— P. 6268—6275.
7. *Oligothymidylate analogues having stereoregular alternating methylphosphonate / phosphodiester backbones* / P. S. Miller, N. Dreon, S. Pulford, K. B. McParland // J. Biol. Chem.— 1980.—255, N 20.— P. 9659—9665.
8. *Oligothymidylate analogues having stereoregular, alternating methylphosphonate / phosphodiester backbones as primers for DNA polymerase* / P. S. Miller, N. D. Anman, K. B. McParland, S. M. Pulford // Biochemistry.— 1982.—21, N 10.— P. 2507—2512.
9. *Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleotide methylphosphonates* / P. S. Miller, J. Yano, E. Yano et al. // Ibid.— 1979.—18, N 23.— P. 5134—5143.
10. *Arylsulfonyltetrazoles, new coupling reagents and further improvements in the triester method for the synthesis of deoxyribooligonucleotides* / J. Stawinski, T. Hozumi, S. A. Narang et al. // Nucl. Acids Res.— 1977.—4, N 2.— P. 353—371.
11. *Твердофазный синтез полидезоксирибонуклеотидов модифицированным триэфирным методом* / Н. В. Амирханов, В. П. Кумарев, М. И. Ривкин, В. Н. Рыбаков // Биоорг. химия.— 1982.—8, № 1.— С. 126—129.
12. *Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. Реакционноспособные фосфамиды моно- и динуклеотидов* // Там же.— 1986.—12, № 4.— С. 475—481.
13. *Модификация НК в стабилизированных комплексах. I. Синтез алкилирующих производных олигонуклеотидов, содержащих на 5'-конце остаток N-(2-оксипропил)феназина* / В. Ф. Зарытова, И. В. Кутявин, В. Н. Сильников, Г. В. Шнишкин // Там же.— № 7.— С. 911—920.
14. *Исследование диастереомеров неонных аналогов олигонуклеотидов. 3. Комплементарно адресованная модификация poly(dA) алкилирующими производными, синтезированными на основе индивидуальных диастереомеров триэтиловых эфиров тетрагидропиримидилуридина* / Т. В. Абрамова, Д. Г. Кнорре, А. В. Лебедев и др. // Там же.— 1985.—11, № 12.— С. 1642—1649.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск

Получено 20.01.88