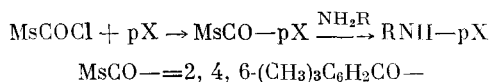


Н. И. СОКОЛОВА, В. В. НОСОВА, З. А. ШАБАРОВА.
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

НОВЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА АМИДОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Разрабатываемый в настоящее время ⁽¹⁾ метод химического сшивания олигонуклеотидных блоков в водных растворах основан на использовании амидов олигонуклеотидов по концевому фосфору. В связи с этим необходимы эффективные, удобные методы их синтеза. Предложенный ранее ⁽²⁾ метод с использованием ДСС имеет ряд недостатков (невысокие выходы, образование нескольких побочных продуктов и др.).

В настоящем сообщении предлагается новый метод синтеза амидов моно- и олигонуклеотидов, основанный на активации нуклеотидной компоненты через смешанный ангидрид с мезитиленкарбоновой кислотой и последующей реакцией с амином:



I=III: X=dT; IV—XI: X=dA; XII—XVI: X=dTpT; XVII—XIX: X=dTpA.

Использование стерически затрудненной 2,4,6-триметилбензойной (мезитиленкарбоновой) кислоты позволяет избирательно активировать концевые фосфатные группы в олигонуклеотидах, не затрагивая межнуклеотидные. Отсутствие активации межнуклеотидного фосфора в реакции с хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты было показано в специальном опыте с использованием динуклеозидфосфата dTpA, который не реагировал с MsCOCl. Наличие в мезитиленкарбоновой кислоте двух заместителей в *о*-положении к карбоксильной группе настолько снижает ее ацилирующую способность, что количественно происходит фосфорилирование амина, а не его ацилирование карбоновой кислотой. Более того, пониженная ацилирующая способность ангидрида мезитиленкарбоновой кислоты позволяет использовать при синтезе амидов моно- и олигонуклеотиды, не защищенные по сахару и аминогруппе гетероциклического основания.

При взаимодействии моно- и динуклеотидов с 5—10-кратным избытком MsCOCl в абсолютном пиридине через 20—30 мин. наблюдали количественное образование смешанного ангидрида. (Более длительное взаимодействие реагентов нецелесообразно, так как может привести к некоторому мезитилированию 3'-гидроксильных групп ⁽³⁾.) Избыток хлорангидрида разрушали водой, мезитиленкарбоновую кислоту экстрагировали эфиром. Полученные смешанные ангидриды моно- и олигонуклеотидов устойчивы в водных растворах при комнатной температуре в течение 3—5 дней. При щелочном гидролизе (2N NaOH, 37°, 24 час.) эти соединения расщепляются до мезитиленкарбоновой кислоты и моно- или олигонуклеотидов ⁽³⁾. Структура смешанных ангидридов была подтверждена также данными ферментативного гидролиза: при обработке ФДЭ змеиного яда образуются мононуклеотиды и мезитиленкарбоновая кислота. Известно, что ФДЭ змеиного яда гидролизует не только фосфодиэфирные, но и пирофосфатные связи в низкомолекулярных субстратах ⁽⁴⁾. По-видимому, набор субстратов для этого фермента может быть расширен за счет смешанных ангидридов моно- и олигонуклеотидов с карбоновыми кислотами.

Таблица 1

Характеристики полученных амидов моно- и динуклеотидов (RNH — pX)

№ соедине- ния	Нуклео- тидный компонент (pX)	Аминокислотный компонент (RNH ₂)	Выход, % от- носительно соответ- ствующ. ангидрида	R _f в системах *			T _{мф} U _{отн.}	Время реак- ции, час.
				А	Б	В		
I	dpT	Аммиак	94	0,35	0,64	—	0,71	48
II		Бензиламин	68	0,76	0,79	—	0,50	24
III		Морфолин	97	0,69	0,75	—	0,42	24
IV		Аммиак	94	0,32	0,38	—	0,3	48
V	dpA	Циклогексиламин	72	0,68	0,69	0,82	0,31	48
VI		Бензиламин	80	0,61	0,69	—	0,32	24
VII		β-Фенилэтиламин	80	—	0,61	—	0,32	24
VIII		Морфолин	96	0,46	0,55	0,4	0,34	24
IX	dpTpT	Этиловый эфир глицина	35	0,5	0,60	0,64	0,24	24
X		n-Анизидин	80	0,53	0,65	0,71	0,35	48
XI		Анилин	60	0,59	0,63	0,73	0,31	48
XII		Циклогексиламин	51	—	0,46	—	0,82	72
XIII	dpTpA	Бензиламин	89	—	0,66	—	0,63	48
XIV		Морфолин	95	0,62	—	—	0,62	48
XV		n-Анизидин	30	0,37	—	—	0,62	72
XVI		Анилин	25	0,38	0,51	—	0,60	72
XVII	dTp	Бензиламин	52	—	0,43	—	0,78	48
XVIII		β-Фенилэтиламин	50	—	0,45	—	0,78	48
XIX	dTp	Морфолин	70	—	0,37	—	0,80	48
XX		Бензиламин	60	0,7	—	—	0,52	48

* Обозначение систем см. экспериментальную часть.

Амиды моно- и олигонуклеотидов получали в водно-пиридиниевом растворе при 37°, действуя на смешанные ангидриды 10—15-кратным избытком амина. Реакционные смеси анализировали через 12, 24, 36, 48, 72 и 96 час. Обнаружено влияние силы амина на скорость превращения смешанного ангидрида в соответствующий фосфоамид. С более сильными аминами (бензиламино, морфолином) реакция протекает практически количественно за 20—24 час. Со слабыми аминами (анилин, n-анизидин) реакция заканчивается через 2 суток.

Полученные амиды моно- и динуклеотидов выделяли с помощью бумажной хроматографии и электрофореза. Выходы, время реакции, а также хроматографические и электрофоретические характеристики полученных соединений приведены в табл. 1.

Структуру амидов доказывали кислотным и ферментативным гидролизом. При обработке 1N HCl при 37° в течение 2 час. синтезированные амиды гидролизались до амина и гетероциклического основания. При инкубации амидов динуклеотидов (соединения XII—XIX) с ФДЭ змеиного яда гидролизуются только фосфодиэфирные связи и образуется мононуклеотид и соответствующий амид мононуклеотида в соотношении 1:1 (см. табл. 2). Фосфоамидные связи в синтезированных амидах фосфодиэстеразой не расщеплялись. Характеристики амидов II и III, полученных синтетически (табл. 1) и выделенных из ферментативного гидролизата соединений XIII и XIV (табл. 2) полностью совпали.

Таким образом, хлорангидрид мезитиленкарбоновой кислоты реагирует избирательно с концевыми фосфатными группами олигонуклеотидов, а образующиеся смешанные ангидриды превращаются в фосфоамиды с высокими выходами. Отсутствие побочных продуктов при образовании смешанных ангидридов позволяет проводить синтез амидов одностадийно, не выделяя смешанного ангидрида. Метод используется в настоящее время для получения амидов более сложных олигонуклеотидов.

Гидролиз амидов динуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда

Соединение	Количественное соотношение компонентов в гидролизате	
XII	dpT : dpT (5' → N) NHC ₆ H ₁₁ *	= 1 : 0,95
XIII	dpT : dpT (5' → N) NHCH ₂ C ₆ H ₅	= 1 : 0,92
XIV	dpT : dpT (5' → N) N 	= 1 : 0,90
XV	dpT : dpT (5' → N) NHC ₆ H ₄ OCH ₃	= 1 : 0,91
XVI	dpT : dpT (5' → N) NHC ₆ H ₅	= 1 : 0,89
XVII	dpA : dpT (5' → N) NHCH ₂ C ₆ H ₅	= 1 : 0,9
XVIII	dpA : dpT (5' → N) NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	= 1 : 0,93
XIX	dpA : dpT (5' → N) 	= 1 : 0,89

* Номенклатуру и сокращенные обозначения нуклеотидил- и полинуклеотидиламидов см. (4)

Хроматографию и электрофорез проводили на бумаге «Filtrak» № 3 и 4. При хроматографии использовали системы: А) изопропиловый спирт — конц. аммиак — вода (7 : 1 : 2); Б) этиловый спирт — 1 М ацетат аммония (7 : 3); В) н-пропиловый спирт — конц. аммиак — вода (55 : 10 : 35).

Горизонтальный электрофорез проводили в течение часа при напряжении 42 в/см в 0,05 М ТЭАБ буфере. dpTpT и dpTpA получали по методу Корана (6). Хлорангидрид мезитиленкарбоновой кислоты синтезировали из мезитилена по описанной методике (7).

Синтез dpT(5' → N)NHCH₂C₆H₅ (II). 40 мг (0,1 мм) диаммонийной соли dpT растворяли в 2 мл абс. пиридина и добавляли 0,16 мл (1 мм) MsCOCl. Реакционную смесь встряхивали 20 мин., затем разбавляли 2 мл воды и экстрагировали эфиром (4 мл × 3) выпавшую мезитиленкарбоновую кислоту. К водно-пиридиновому раствору добавляли 0,1 мл (1 мм) бензиламина. Реакционную смесь выдерживали в термостате при 37° в течение суток и хроматографировали на бумаге. Характеристики соединения II приведены в табл. 1. Соединения I, III—XX получены аналогично.

Гидролиз соединений XII—XIX фосфодиэстеразой змеиного яда проводили в фосфатном буфере (рН 8,6) при 37° в течение 2 час. Гидролизат подвергали препаративному электрофорезу. У.-ф. поглощающие зоны с $U_{отн. рТ} = 1$ и $U_{отн. рТ} = 0,5$ элюировали и спектрофотометрировали при $\lambda = 260$ мμ.

Результаты ферментативного гидролиза представлены в табл. 2.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
25 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Z. A. Shabarova, M. A. Prokofiev, FEBS Letters, **11**, 237 (1970). ² Н. И. Соколова, Л. Г. Гатинская и др., ДАН, **196**, 613 (1971). ³ M. W. Moon, H. G. Khogana, J. Am. Chem. Soc., **88**, 1805 (1966). ⁴ Л. Б. Долопчиев, Биохимия, **35**, 1073 (1970). ⁵ Z. A. Shabarova, Progr. Nucl. Acad. Res. and Mol. Biol., **10**, 145 (1970). ⁶ R. K. Ralph, H. G. Khogana, J. Am. Chem. Soc., **83**, 2926 (1960). ⁷ Синтезы органических препаратов, Сборн. 2, ИЛ, 1949, стр. 118.