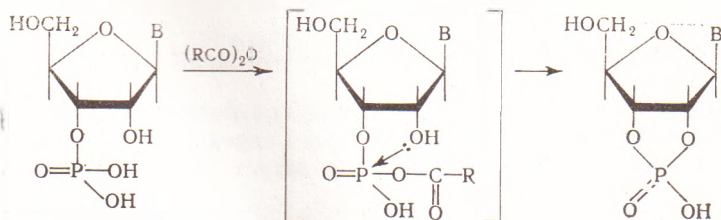


В. В. НОСОВА, Н. И. СОКОЛОВА, З. А. ШАБАРОВА,
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

СИНТЕЗ СМЕШАННЫХ АНГИДРИДОВ N-ЗАЩИЩЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ И ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ

В настоящее время одним из наиболее перспективных методов получения достаточно длинных олигонуклеотидов представляется сочетание химического синтеза небольших олигомерных блоков с последующим соединением их на комплементарной матрице. Эффективность матричных реакций в значительной степени определяется выбором агента, активирующего концевую фосфатную группу олигомера. Активация фосфатной группы должна быть достаточно мощной, так как гидроксильная группа — довольно слабый нуклеофил. Ранее была показана принципиальная возможность использования амидов олигодезоксиденилатов для образования новой межполимерной связи в присутствии комплементарной матрицы — полиуридилевой кислоты (¹, ²).

В настоящей работе описывается синтез еще одного класса активированных по концевому фосфору олигонуклеотидов с ангидридным типом связи аминокислоты и олигомера — аминокислотилолигонуклеотидов, в которых аминокислота аминокислоты блокирована. На основании свойств смешанных ангидридов можно предположить, что такие соединения, наряду с амидами, могут быть интермедиатами в матричной реакции образования новой межполимерной связи. Фосфатная и карбоксильная группы в ацилфосфатах имеют общую черту — центральный атом в них несет частичный положительный заряд и способен атакаться нуклеофильными агентами. Поэтому ацилфосфаты могут быть и ацилирующими и фосфорилирующими агентами. Наиболее характерна для них реакция ацилирования (³). С другой стороны, при синтезе 2', 3'-циклофосфатов нуклеотиды обрабатываются ангидридами карбоновых кислот (⁴). Активными промежуточными соединениями в этой реакции служат ацилфосфаты, которые становятся внутримолекулярно-фосфорилирующими агентами при наличии пространственно сближенной 2'-гидроксильной группы.



В-гетероциклическое основание

Это дает основания полагать, что в условиях матричной реакции, когда комплементарные взаимодействия обеспечивают сближение активированной фосфатной группы одного олигомера с гидроксилом другого, ацилфосфаты будут фосфорилирующими агентами.

Таким образом, прежде всего необходимо было осуществить синтез смешанных ангидридов олигонуклеотидов и N-защищенных аминокислот. Смешанные ангидриды АМФ с аминокислотами исследовались в связи с

изучением биосинтеза белка, в процессе которого аминоксилатидилаты являются активными промежуточными соединениями (³, ⁵⁻⁷). Производные олигодезоксинуклеотидов до сих пор не описаны.

При разработке метода синтеза этих соединений мы использовали активацию аминокислоты через смешанный ангидрид с этиловым эфиром угольной кислоты. В качестве аминокислотного компонента применяли бензилоксикарбонил-(Z), трет.-бутилоксикарбонил (BOc) — и формил-(F) аминокислоты. Отсутствие реакции активированных аминокислот с нуклеотидными фосфатными группами было показано в модельном опыте с использованием dApA с BocNHCH₂COOCOOC₂H₅. Этот опыт показал, что смешанные ангидриды N-защищенных аминокислот и этилового эфира угольной кислоты могут быть использованы для избирательной модификации концевой фосфатной группы в олигонуклеотидах:



Активацию N-защищенных аминокислот проводили в абсолютном диоксане действием этилового эфира хлоругольной кислоты при 0°. Через 30 мин. добавляли нуклеотидную компоненту в виде раствора ее три-изо-октиламмониевой соли в абсолютном диметилформамиде. Максимальный выход смешанного ангидрида достигается через 2 часа.

При синтезе смешанных ангидридов dpC этим методом, как и следовало ожидать (³), кроме реакции по фосфатной группе, ацилировалась аминная группа цитозина. Полученный смешанный ангидрид ($U_{\text{отн}} \text{ dpC} = 0,5$) имел $\lambda_{\text{max}} = 245, 295$ нм, вместо 271 нм характерного для незамещенной по аминогруппе цитидиловой кислоты.

Известно, однако, что в водноорганических средах реакционная способность аминогруппы цитозина понижается и она не реагирует с активированными аминокислотами (⁹). Следовательно, для того чтобы провести избирательную модификацию только концевой фосфатной группы олигомеров гетерогенного состава, реакцию проводили в водных средах. При синтезе смешанных ангидридов в водных растворах исключается довольно трудоемкая операция перевода нуклеотидной компоненты в форму растворимых в органических растворителях (три-изо-октиламмониевых или цетавлоновых) солей. Лимитирующей стадией при синтезе смешанных ангидридов моно- и олигонуклеотидов в водных растворах является устойчивость активированной аминокислоты. Был определен период полураспада ($\tau/2$) для активированных аминокислот в водноорганической среде (вода — диоксан 1 : 1). Так, $\tau/2$ для BocNHCH₂COOCOOC₂H₅ определен гидроksamовой реакцией на «активный ацил» (³, ¹⁰), составил при 20° 1,5 часа. Определив таким образом оптимальное время реакции, синтез ряда смешанных ангидридов моно- и олигонуклеотидов был осуществлен добавлением диоксанового раствора активированной аминокислоты к водному раствору нуклеотидной компоненты. Предварительно оба раствора охладились до 0°. Через 2 часа реакционные смеси хроматографировались па бумаге в системе А при +4°.

Выходы аминокислот-нуклеотидов и олигонуклеотидов в органических и водноорганических средах, хроматографические и электрофоретические характеристики полученных соединений представлены в табл. 1. у.ф. спектры синтезированных смешанных ангидридов имеют то же значение λ_{max} , как и исходные нуклеотиды. Как видно из данных табл. 1, выходы в водноорганической среде несколько ниже, чем в абсолютных органических растворителях, так как вода снижает нуклеофильность гидроксильных фосфатных групп за счет их диссоциации.

Структуру полученных соединений доказывали гидроксамовой реакцией на «активный ацил» (¹⁰). Для производных, содержащих триптофан, проводили щелочной гидролиз (0,1N NaOH, 20 мин., 20°) с последующей хро-

Выходы и характеристики смешанных ангидридов *N*-ациламино кислот и моно-(олиго) нуклеотидов

Соединение	Выход, %		R_f в системах		$U_{отн}$ дРА
	вода — диоксан (1 : 1)	ДМФ — диоксан (1 : 1)	А	Б	
ZGlyдpA	—	90	0,58	—	0,45
ВосGlyдpA	60	98	0,71	0,67	0,51
ВосAlадpA	—	94	0,67	—	0,38
ВосTnyдpA	44	100	0,73	0,77	0,57
FGlyдpA	19	20	—	0,36	0,45
FPhedpA	52	60	0,81	0,56	0,40
ВосGlyдpC	20	—	0,86	—	0,53
ВосGlyдpApA	40	—	—	0,23	0,73
ВосTnyдpApA	35	—	0,34	0,48	0,72
ZGlyдpApApA	—	67	0,26	—	0,70
ВосGlyдpApApA	—	60	0,138	—	0,72
ВосTnyдpApApA	—	34	0,108	—	0,76

матографией и спектрофотометрированием продуктов. Соотношения аминокислота-нуклеотид близки 1 : 1.

Таким образом, предложен общий метод синтеза смешанных ангидридов *N*-защищенных аминокислот с моно- или олигонуклеотидами различного состава.

Хроматографию и электрофорез проводили на бумаге «Filtrak» № 1 при +4° С. При хроматографировании использовали системы: А — этиловый спирт — 1*M* ацетат аммония рН 5 (7 : 3); Б — *n*-бутиловый спирт — вода — уксусная кислота (5 : 3 : 2).

Горизонтальный электрофорез проводили при +4° в течение 3,5 час. при напряжении 350 в в 0,05*M* ТЭАБ-буфере, рН 7.

Общая методика синтеза смешанных ангидридов.

а) Синтез в абсолютных органических растворителях 0,075 ммол *N*-ациламино кислоты сушили упариванием с абсолютным диоксаном, растворяли в 0,1 мл абс. диоксана, охлаждали до 0°, прибавляли 0,036 мл три-*n*-бутиламина и 0,011 мл этилового эфира хлоругольной кислоты. Смесь выдерживали 30 мин. при 0° и затем прибавляли раствор 0,025 ммол три-*n*-октиламониевой соли нуклеотида в 0,1 мл абсолютного диметилформамида. Через 2 часа реакционную смесь выливали в охлажденный абсолютный эфир, осадок центрифугировали и несколько раз промывали эфиром.

б) Синтез в водноорганических средах. К раствору 0,075 ммол активированной аминокислоты, полученной, как указано выше, прибавляли охлажденный до 0° водный раствор 0,008 ммол нуклеотида. Реакционную смесь выдерживали 2 часа при комнатной температуре, экстрагировали эфиром и хроматографировали на бумаге в системе А.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
17 IV 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. К. Недбай, Н. И. Соколова и др., ДАН, т. 205, 1114 (1972).
- ² Л. Г. Гагинская, Н. А. Соколова и др., Изв. АН СССР, сер. хим., 1974, 221.
- ³ К. Moldave, P. Castellfranko, A. Meister, J. Biol. Chem., v. 234, 841 (1959).
- ⁴ А. М. Микельсон, Химия нуклеозидов и нуклеотидов, М., 1966, стр. 148.
- ⁵ J. A. De Moss, S. M. Genuth, G. D. Novell, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 42, 325 (1956).
- ⁶ P. Berg, J. Biol. Chem., v. 233, 608 (1958).
- ⁷ А. М. Michelson, R. Letters, Biochim. et biophys. acta, v. 80, 242 (1964).
- ⁸ З. А. Шабарова, Н. И. Соколова, М. А. Прокофьев, ЖОХ, т. 27, 2, 891 (1957).
- ⁹ Т. Л. Цилевич, А. А. Краевский, Б. П. Готлих, Усп. хим., т. 41, 1766 (1972).
- ¹⁰ P. Lipmann, L. C. Tuttle, J. Biol. Chem., v. 159, 21 (1945).