



УДК 547.963.32

АКТИВНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ЦВИТТЕР-ИОННОЙ КОНЦЕВОЙ ФОСФАТНОЙ ГРУППОЙ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ АФФИННЫХ РЕАГЕНТОВ И ЗОНДОВ

Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Мальцева Т. В.,
Халимская Л. М.*

Новосибирский институт биорганической химии Сибирского
отделения Академии наук СССР

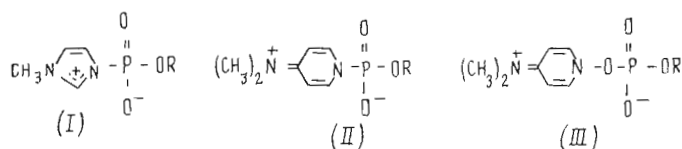
*Новосибирский государственный университет

Разработан метод синтеза и выделения производных олигонуклеотидов с цвиттер-ионной концевой фосфатной группой, содержащей остаток MeIm, DMAP или DMAPO. На примере производных мононуклеотида исследована реакционная способность таких соединений по отношению к различным нуклеофилам и зависимость скорости гидролиза от pH раствора. Установлено, что эти соединения быстро и почти количественно взаимодействуют с алифатическими аминами и гораздо медленнее с водой, анилином и метанолом. Реакционная способность нуклеотидных производных MeIm примерно в 5 раз выше, чем у соединения с DMAP, и на 2 порядка выше, чем у производных DMAPO. Показана перспективность использования такого способа активации концевой фосфатной группы для синтеза различных фосфамидов олигонуклеотидов.

В настоящее время все более широкое применение находят производные олигонуклеотидов, способные взаимодействовать с функциональными группами белков и нуклеиновых кислот. Такие производные, содержащие активированную концевую фосфатную группировку, могут быть использованы для аффинной модификации нуклеотидзависимых ферментов, ДНК-расплетающих и регуляторных белков, для прямого воздействия на геном, для введения в олигонуклеотиды флуоресцентных, спиновых и других меток, иммобилизации олигонуклеотидов на белках и других макромолекулах и т. д. Для решения этих задач необходимо дальнейшее развитие и совершенствование методов синтеза активных фосфорилирующих производных олигонуклеотидов.

Недавно нами был предложен новый тип производных моно- и динуклеотидов с цвиттер-ионной концевой фосфатной группой, содержащей остаток 1-метилимидазола и 4-диметиламинопиридина [1]. Был разработан метод получения таких производных с использованием смеси трифенилфосфина и дипиридилдисульфида, проведено их выделение и показана высокая реакционная способность по отношению к алифатическим аминам.

В настоящей работе осуществлен синтез и выделение производных олигонуклеотидов с присоединенными к концевому фосфату остатками MeIm (I), DMAP (II) и DMAPO (III) и продолжено исследование их реакционной способности. Выбор DMAPO связан с использованием подобных соединений в качестве нуклеофильных катализаторов реакций фосфорилирования [2].



а) R = TrT в) R = T(Ac)

б) R = C₆H₅ г) R = GCCAAACrA, T₁₀, GATCC, AG, STTGTTTCTAC

Принятые сокращения: (Pys)₂ — 2,2'-дипиридилдисульфид, MeIm — N-метилимидазол, DMAP — 4-диметиламинопиридин, DMAPO — 4-диметиламинопиридин-1-оксид, DMF — диметилформамид, символ «d» в обозначениях дезоксирибонуклеотидов и их производных опущен.

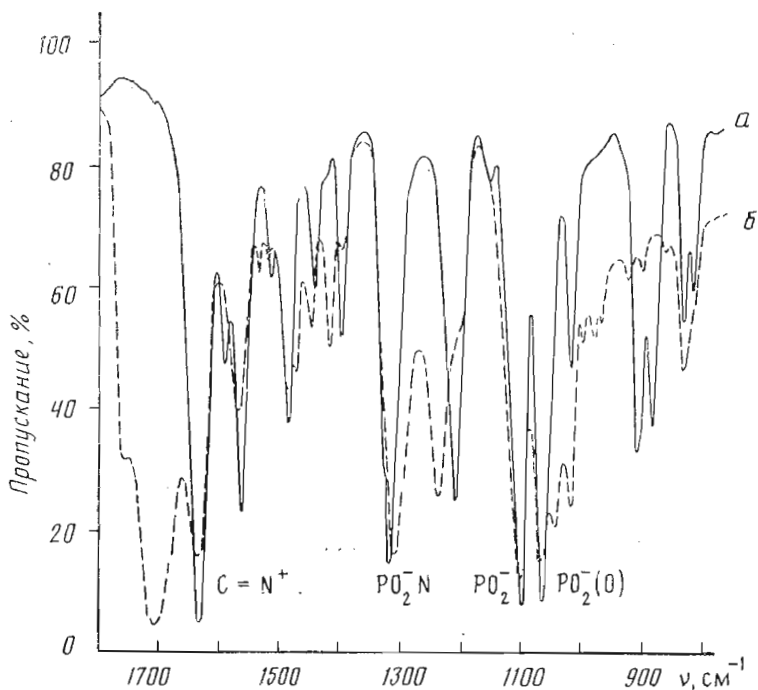


Рис. 1. ИК-спектры производных ДМАР (IIб) (а) и (IIв) (б) в области 1700—700 см⁻¹, с = 0,25% в КВг

По данным ³¹P-ЯМР, при взаимодействии динуклеотидов с MeIm или ДМАР и смесью Ph₃P и (PyS)₂ происходит быстрое и количественное образование производных (Iа) и (IIа), содержащих фосфамидную связь только по концевой фосфатной группе динуклеотида [1].

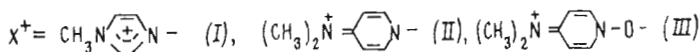
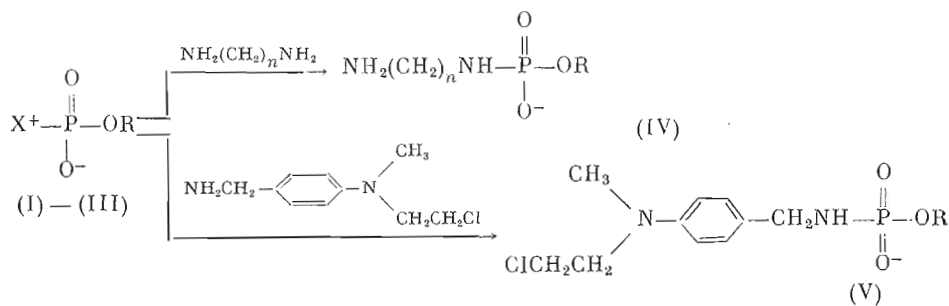
При реакции рТрТ с 5 экв. ДМАРО и 3 экв. смеси Ph₃P и (PyS)₂ в DMF в спектрах ³¹P-ЯМР не наблюдается каких-либо изменений межнуклеотидной фосфатной группы (δ = -2,0 м. д.), а вместо сигнала концевого фосфата при -1,5 м. д. появляется сигнал продукта реакции при -0,5 м. д. Добавление 5 экв. бензиламина в DMF к продукту, выделенному осаждением эфиром, через 10 мин приводит к количественному превращению его в бензиламид рТрТ. Об этом свидетельствует смещение сигнала концевого фосфата в слабое поле (δ = 6,4 м. д. [1]).

Можно предположить, что в случае ДМАРО, так же как и при реакции с MeIm и ДМАР, образуется соединение (IIIа) с цвиттер-ионной концевой фосфатной группой, обладающее высокой реакционной способностью по отношению к алифатическим аминам.

Регистрация таких производных может быть осуществлена с помощью не только ³¹P-ЯМР, но и ИК-спектроскопии. Ранее при изучении ИК-спектра пиридиниевого производного фенилфосфорной кислоты было показано [3], что его образование сопровождается появлением интенсивных полос при 1330 и 1130 см⁻¹, соответствующих валентным колебаниям PO₂-N- и PO₂⁻-фрагментов. Такие же полосы наблюдаются в ИК-спектрах соединений (Iб), (IIб) и (IIIб), полученных по аналогии с соответствующими нуклеотидными производными при взаимодействии фенилфосфорной кислоты с MeIm, ДМАР, ДМАРО в присутствии смеси Ph₃P и (PyS)₂ (рис. 1). В случае производных мононуклеотида (Iв), (IIв) и (IIIв) регистрируются аналогичные полосы при 1310—1315 и 1110 см⁻¹, по-видимому, принадлежащие валентным колебаниям фрагментов PO₂-N₃, PO₂⁻-O и PO₂⁻. Таким образом, данные ИК-спектроскопии также свидетельствуют о превращении фосфоэфирной группы в цвиттер-ионную, содержащую остаток гетероцикла.

Далее была изучена возможность синтеза производных олигонуклеотидов с присоединенными к концевому фосфату остатками MeIm (Iг),

DMAP (IIr) и DMAPO (IIIr) при использовании низких концентраций (20—100 ОЕ₂₆₀/мл) олигонуклеотидов. Доказательством образования соединений (Iг), (IIг) и (IIIг) служило их превращение в стабильные фосфамиды типа (IVг) при реакции с водным раствором полиметиленамина.



$$n = 2, 3, \dots, 7$$

а) R = Trp

б) R = T(Ac)

г) R = GCCAAACrA, T₁₀, GATCC, AG, CTGTTCCTAC

Полученные фосфамиды типа (IVг) были проанализированы ионообменной хроматографией. Превращение близко к количественному (рис. 2а), т. е. выходы производных олигонуклеотидов с цвиттер-ионной концевой фосфатной группой типа (Iг), (IIг) и (IIIг) не менее 90%. Для подтверждения фосфамидной природы связи в соединениях (IVг) был проведен кислотный гидролиз производного декатимидилата (IVг, R = T₁₀) до исходного олигонуклеотида (рис. 2б). Соединения (I) и (II) так же быстро (не более чем за 10 мин) реагируют с амином, содержащим алкилирующую группировку, с образованием фосфамидов (V).

Предложенный метод синтеза активных фосфорилирующих производных олигонуклеотидов типа (I—III) и их превращения в стабильные фосфамиды типа (IV) и (V) делает возможным использование производных с цвиттер-ионной концевой фосфатной группой для синтеза различных фосфамидов олигонуклеотидов. Существовавшие до сих пор методы намного менее эффективны, особенно в случае сильноосновных аминов. Так, образование фосфамидов в присутствии водорастворимого карбодимида [5], как и при использовании смешанных ангидридов с мезитилкарбоновой кислотой [6] или имидазолидов [7], протекает значительно медленнее (не менее 20 ч). В присутствии Ph₃P и (PyS)₂ без стадии промежуточного образования соединений (I)—(III) скорость реакции и выход фосфамида уменьшаются с ростом рK_a амина [8].

Реакционная способность производных (I)—(III) по отношению к слабым основаниям была исследована на примере реакций с водой, имидазолом, авилином и метанолом. При изучении процесса гидролиза производных мононуклеотида (Iв) и (IIв), содержащих остаток MeIm и DMAP, в водном DMF было установлено, что скорость реакции производного (Iв) в ~5 раз выше, чем для соединения (IIв) [1]. Продуктами реакции являются мононуклеотид рT(Ac) и его пиррофосфат O[rT(Ac)]₂. При сравнении кинетических характеристик гидролиза производных (Iв) и (IIв) [1] и соединения (IIIв) (рис. 3), представленных в табл. 1, видно, что соотношение скоростей реакции производных (Iв), (IIв) и (IIIв) составляет 75 : 15 : 1.

По данным ³¹P-ЯМР, производные (Iв) и (IIв) быстро (<4 мин) и практически количественно реагируют с 5 экв. имидазола в DMF, образуя имидазолид рT(Ac) (δ = 10,3 м. д. [9]). При взаимодействии соединения (IIIв) с 5 экв. имидазола выход имидазолида рT(Ac) составляет ~30%, тогда как ~70% соединения (IIIв) остается непрореагировавшим.

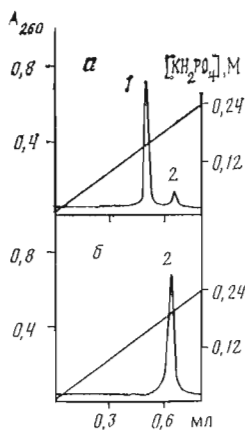


Рис. 2

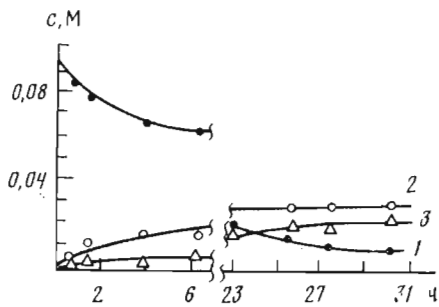


Рис. 3

Рис. 2. Ионобменная МХХ на полисиле СА [4] соединения (IVr), полученного реакцией производного MeIm (Iг, R = T₁₀) с тетраметилэтидиамином (а), и после инкубации производного (IVг, R = T₁₀) в 0,05 М НСl в течение 1 ч при 40° С (б). Колонка 60 мкл, элюент — калий-фосфатный буфер, рН 7,5, скорость элюции 300 мкл/ч. 1 — (IVг, R = T₁₀, n = 4); 2 — (pT)₁₀

Рис. 3. Кинетика гидролиза 0,1 М производного (IIIв) в DMF, содержащем 7,7% H₂O, при 38°С. 1 — (IIIв), 2 — pT(Ac), 3 — O[pT(Ac)]₂

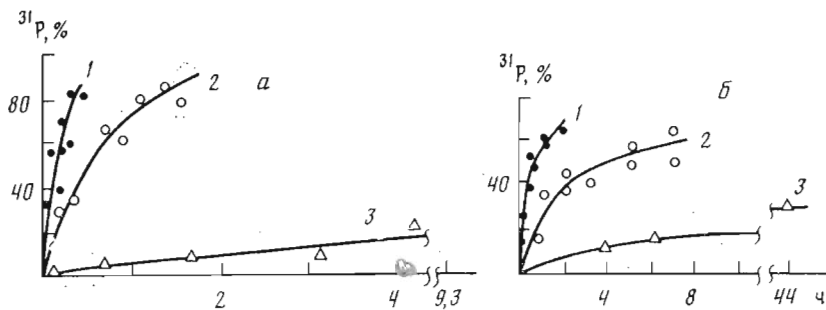


Рис. 4. Кинетика накопления продуктов реакций при 38°С в DMF при взаимодействии 0,1 М производных pT(Ac) (1 — Iв, 2 — IIв, 3 — IIIв) с 2,2 М анилином (а) и 1,9 М метанолом (б)

Добавление 27 экв. анилина к производным мононуклеотида (Iв), (IIв) и (IIIв) в DMF приводит к накоплению анилида pT(Ac) ($\delta = 2,0$ м. д. [1]). Наряду с анилидом pT(Ac) в некоторых случаях образуются pT(Ac) и O[pT(Ac)]₂, т. е. в отличие от реакции с алифатическими аминами выход анилида зависит от присутствия воды в реакционной смеси. Отношение скоростей реакции с анилином производных MeIm, DMAP и DMAPO составляет примерно 100 : 20 : 1 (рис. 4, табл. 1). По данным ³¹P-ЯМР, реакция соединений (Iв), (IIв) и (IIIв) с 20 экв. метанола в DMF с образованием метилового эфира pT(Ac) ($\delta = 0,1$ м. д.) протека-

Таблица 1

Кинетические характеристики реакций производных pT(Ac) с водой, анилином и метанолом при 38°С в DMF

Соединение	<i>k</i> , мин ⁻¹	<i>t</i> _{1/2} , мин		
	H ₂ O (4,2 М)	H ₂ O (4,2 М)	C ₆ H ₅ NH ₂ (2,2 М)	CH ₃ OH (1,9 М)
Iв	(7,2±0,4) · 10 ⁻² [1]	9,6	7	34
IIв	(1,5±0,2) · 10 ⁻² [1]	46	36	246
IIIв	(9,7±0,8) · 10 ⁻⁴	714	693	5050

ет очень медленно и также сопровождается гидролизом исходных соединений. Из кинетических кривых рис. 4 и табл. 1 можно заключить, что реакционная способность по отношению к метанолу у производного MeIm в ~ 7 и ~ 150 раз выше, чем у производных DMAР и DMAPO соответственно.

Из полученных данных следует, что цвиттер-ионные производные нуклеотида очень быстро реагируют с алифатическими аминами и медленно — с водой, анилином и метанолом, причем скорости реакций с водой и анилином близки, тогда как взаимодействие с метанолом протекает в ~ 5 раз медленнее, чем гидролиз. Наиболее активно по отношению к нуклеофилам производное MeIm (Iв), реакционная способность соединения (Iв) в ~ 5 раз ниже. Производное DMAPO (IIIв) наименее активно, скорость его реакций на 2 порядка ниже, чем у производного MeIm.

Зависимость скорости реакций этих соединений от pH раствора была исследована на примере гидролиза. Для этого производные рТ(Ас) (Iв) и (IIIв), выделенные осаждением эфиром, были растворены в 0,05 М оксалаатном буфере (pH 1,6) или в 1 М бикарбонатном буфере (pH 8,8) и за

реакциями следили методом ^{31}P -ЯМР. Гидролиз соединения (Iв) проводили при 20°C , а в случае медленно гидролизующегося производного (IIIв) — при 38°C . В отличие от имидазолидов олигонуклеотидов, активных в реакциях фосфорилирования только после протонирования [7], соединения с цвиттер-ионной концевой фосфатной группой содержат в своей структуре положительный заряд вблизи атома фосфора и не нуждаются в протонировании перед реакцией. Поэтому эти производ-

Таблица 2

Константы скоростей псевдопервого порядка гидролиза производных рТ(Ас) при pH 1,6 и 8,8

Соединение	$k \cdot 10^3, \text{ мин}^{-1}$	
	pH 1,6	pH 8,8
Iв (20°C)	$3,0 \pm 0,3$	$32 \pm 1,0$
IIIв (38°C)	$1,3 \pm 0,2$	$8,0 \pm 1,1$

ные способны гидролизываться не только в кислой или нейтральной, но и в щелочной среде. Так, при увеличении pH от 1,6 до 8,8 скорость гидролиза возрастает в 6—10 раз (табл. 2). По-видимому, это связано с тем, что в щелочной среде происходит атака атома Р гидроксил-анионом, более сильным нуклеофилом, чем вода.

Способность производных олигонуклеотидов, содержащих цвиттер-ионные концевые фосфатные группы, реагировать с нуклеофилами без предварительного протонирования, так же как их высокая реакционная способность по отношению к аминам, позволяет использовать такие производные для синтеза олигонуклеотидил(5'-N)пептидов [10]; для модификации ферментов в условиях, когда аминокислоты белков находятся в активном (непротонированном) состоянии. Благодаря отсутствию спейсера в таких производных они могут модифицировать нуклеотидсвязывающие ферменты вблизи их центров связывания. Первые результаты использования этих производных в качестве аффинных реагентов и зондов были получены на примере таких ферментов, как РНКказа А [11] и РНК-полимераза *E. coli* [12].

Недавно для модификации нуклеиновых кислот в стабилизированных комплементарных комплексах был предложен новый тип реагентов-олигонуклеотидов, содержащих одновременно алкилирующую группировку и остаток четвертичной соли феназина; для получения этих реагентов также были использованы производные олигонуклеотидов с цвиттер-ионной концевой фосфатной группой [13].

Экспериментальная часть

В работе использованы рТ(Ас), рТрТ, 4-[N-метиламино-N-(2-хлорэтил)]бензиламин отечественного производства, олигонуклеотиды, полученные В. В. Горном и И. В. Кутявиным по методам [14, 15]. Используются также MeIm (Serva, ФРГ), DMAР (Bergkamen, Западный Берлин),

Выходы и хроматографические характеристики (XX) олигонуклеотидов и их производных (IVг) и (Vг)

Соединение	Выход, %	XX *
pGCCAAACrA		0,13
NH ₂ (CH ₂) ₄ NHrpGCCAAACrA	97	0,11
(pT) ₁₀		0,16
NH ₂ (CH ₂) ₄ NHrpT(pT) ₉	94	0,14
pGATCC		0,10
NH ₂ (CH ₂) ₄ NHrpGATCC	95	0,07
pAG		7,6
$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\text{NHrpAG} \end{array}$	80	20
ClCH ₂ CH ₂		
pCTTGTTCCTAC		12
$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\text{NHrpCTTGTTCCTAC} \end{array}$	75	16
ClCH ₂ CH ₂		

* Приведены концентрации K₂HPO₄ (M) или ацетонитрила (%) (для четырех последних соединений), при которых элюируются олигонуклеотиды и их производные. Условия ионообменной хроматографии даны в подписи к рис. 2, обращенно-фазовой — в «Экспериментальной части».

Ph₃P, (PyS)₂ и полиметилендиамины (Fluka, Швейцария), DMAPO, полученный по методу [16]. Спектры ³¹P-ЯМР записывали на импульсном спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-NC 12 (Bruker Physic, ФРГ), ИК-спектры — на спектрометре Perkin — Elmer 180 (США). Аналитическую ионообменную хроматографию проводили на хроматографе «Милихром» (СССР), препаративную обращенно-фазовую хроматографию — на хроматографе Altex-332 (США), производное динуклеотида (IIIa) получали по аналогии с соединениями (Ia) и (IIa) [1].

Производные фенилфосфорной кислоты (Iб), (IIб) и (IIIб). Смесь 0,12 ммоль фенилфосфорной кислоты, 0,36 ммоль Ph₃P, 0,36 ммоль (PyS)₂ и 0,6 ммоль MeIm, DMAP или DMAPO в 1,2 мл DMF выдерживали 10 мин при 20° С и осаждали 25 мл эфира. ИК-спектр соединения (IIб) приведен на рис. 1. ³¹P-ЯМР (δ, м. д.): —16,6 (Iб), —12,1 (IIб), —5,8 (IIIб).

Производные олигонуклеотидов (Iг), (IIг) и (IIIг). Реакционную смесь, содержащую 2—10 ОЕ₂₆₀ цетавлоновой соли олигонуклеотида, 15 мкмоль Ph₃P, 15 мкмоль (PyS)₂ и 30 мкмоль MeIm, DMAP или DMAPO в 0,1 мл DMF, выдерживали 10 мин при 20° С и соединения (Iг), (IIг) и (IIIг) осаждали 1,5 мл 2% раствора LiClO₄ в ацетоне. Осадок растворяли в 1 мл 1 М водного раствора полиметилендиамина, через 10 мин нуклеотидный материал отделяли от избытка амина гель-фильтрацией на сефадексе G-10 (колонка 3 × 150 мм, скорость элюции 100 мкл/мин) и анализировали с помощью ионообменной хроматографии (рис. 2). Выход фосфамидов типа (IVг) не менее 90% (табл. 3).

Взаимодействие производных олигонуклеотидов (Iг) и (IIг) с амином, содержащим алкилирующую группировку. 10 экв. 4-[N-метиламино-N-(2-хлорэтил)бензиламина добавляли к растворам полученных производных MeIm (Iг) или DMAP (IIг) в DMF (без предварительного выделения). Через 10 мин фосфамиды (Vг) осаждали 2% раствором LiClO₄ в ацетоне и выделяли с помощью ВЭЖХ на колонке (4,6 × 250 мм) с Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ); линейный градиент концентрации ацетонитрила от 0 до 20—50% в 0,05 М LiClO₄. Выход 75—80% (табл. 3). Содержание ковалентно-связанного хлора (не менее 90%) определяли реакцией с этилендиамином по методу [17].

Реакционная способность производных pT(Ac), содержащих остатки MeIm (Iв), DMAP (IIв) и DMAPO (IIIв). Соединения (Iв) и (IIв) получа-

ли как описано в работе [1], (IIIв) — по аналогии с этой работой. Количественное образование этих производных регистрировали с помощью ^{31}P -ЯМР (DMF); $\delta_{\text{IV}} = -11,1$ м. д. [1], $\delta_{\text{IV}} = -7,1$ м. д. [1], $\delta_{\text{IIIв}} = -0,5$ м. д. Затем добавляли нуклеофилы: H_2O или CH_3OH (0,1 мл), анилин (0,3 мл), имидазол (40 мг) и через определенные промежутки времени записывали спектры ^{31}P -ЯМР реакционных смесей. Химические сдвиги сигналов продуктов реакции (δ , м. д.): рТ(Ас) $-0,2$ [1], метило-вый эфир рТ(Ас) $+0,1$, анилид рТ(Ас) $-2,0$ [1], имидазолид рТ(Ас) $-10,3$ [9]. Кинетические данные приведены на рис. 3 и 4 и в табл. 1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. // Биоорганич. химия. 1986, Т. 12. № 4. С. 475—481.
2. Ефимов В. А., Чахламчева О. Г. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 8. С. 1087—1096.
3. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кнорре Д. Г., Коробейничева И. К., Мальцева Т. В. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 255. № 2. С. 355—358.
4. Ястребов С. И. Способ получения сорбента. А. с. 1113976 СССР // Б. И. 1985. № 17. С. 28.
5. Готтш М. Б., Ивановская М. Г., Шабарова З. А. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 8. С. 1063—1067.
6. Shumyantzeva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1976. V. 3. № 4. P. 903—916.
7. Chu V. C. F., Wahl G. M., Orgel L. E. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 18. P. 6513—6529.
8. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Лебедев А. В., Райт В. К., Самуков В. В. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1986. Вып. 2. С. 110—115.
9. Лебедев А. В., Резвухин А. И. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 2. С. 149—185.
10. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Ярмолюк С. Н., Алексеева И. В. // Биополимеры и клетки. 1988. Т. 4. № 4. С. 220—222.
11. Knorre D. G., Vuneva V. N., Varam G. I., Godovikova T. S., Zarytova V. F. // FEBS Lett. 1986. V. 194. № 1. P. 64—69.
12. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кутявин И. В., Царев И. Г. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1678—1681.
13. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911—920.
14. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 516—521.
15. Горн В. В., Зарытова В. Ф. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 808—814.
16. Ochiai E. Y. // Org. Chem. 1953. V. 18. № 5. P. 534—551.
17. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Лебедев А. В., Самуков В. В., Шишкин Г. В. // Биоорганич. химия. 1975. Т. 1. № 6. С. 793—799.

Поступила в редакцию
14.XI.1988
После доработки
1.III.1989

REACTIVE OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES WITH A ZWITTER-IONIC TERMINAL PHOSPHATE GROUP FOR AFFINITY REAGENTS AND PROBE CONSTRUCTION

GODOVIKOVA T. S., ZARYTOVA V. F., MALTZEVA T. V., KHALIMSKAYA L. M.*

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

** Novosibirsk State University*

Method of synthesis and isolation of oligonucleotide derivatives with a zwitter-ionic terminal phosphate group, containing N-methylimidazole (MeIm), 4-dimethylaminopyridine (DMAP) or 4-dimethylaminopyridine 1-oxide (DMAPO) residues has been developed. Mononucleotide derivatives were used to study the reactivity of these compounds to various nucleophiles and the dependence of hydrolysis rate on pH of solution. These compounds interact rapidly and quantitatively with aliphatic amines and much slower with water, aniline and methanol. MeIm derivatives are most active to nucleophiles, whereas the reactivity of DMAP derivatives is ca. 5 times lower and that of DMAPO derivatives is lower by 2 order of magnitude. This method of activating terminal phosphate group is promising for synthesis of various oligonucleotide phosphoramidates.