



УДК 547.963.32

## СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НУКЛЕОТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСИЛАМИНОВ

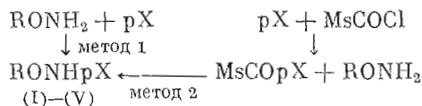
*Шумянцева В. В., Холутов Р. М.*

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Синтезированы не описанные ранее нуклеотидил-(5' → N)-O-алкилгидроксиламины  $\text{RONHrX}$  ( $\text{R} = \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-$ ,  $\text{CH}_3-$ ,  $\text{NH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_4-$ ;  $\text{X} = \text{A}$ , dT, dTrTrT). Изучены условия расщепления связи фосфор—азот в синтезированных соединениях. Показано, что алкоксиамиды нуклеотидов в присутствии нуклеофильных (пиридин) или электрофильных (карбонильные соединения) агентов могут проявлять фосфорилирующие свойства.

Как известно, активность связи фосфор — азот в N-замещенных амидах нуклеотидов зависит от природы заместителя при амидном азоте, на чем, в частности, основано использование их в качестве эффективных фосфорилирующих агентов [1]. С этой точки зрения интерес представляли до сих пор не описанные нуклеотидные производные O-алкилгидроксиламинов, тем более что некоторые N-ацил-O-алкилгидроксиламины, в особенности циклические эфиры гидроксамовых кислот, обладали выраженными ацилирующими свойствами [2], а P—N-связь в N-фосфорилированном гидроксилаmine оказалась настолько активной, что претерпевала гидролиз в момент образования [3].

Нуклеотидил-(5' → N)-O-алкилгидроксиламины были получены нами двумя способами. Первый заключался в конденсации нуклеотида и O-алкилгидроксиламинов в присутствии дициклогексилкарбодимида (метод 1)



(I)  $\text{R} = \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-$ ,  $\text{X} = \text{A}$

(II)  $\text{R} = \text{CH}_3-$ ,  $\text{X} = \text{A}$

(III)  $\text{R} = \text{NH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_4-$ ,  $\text{X} = \text{A}$

(IV)  $\text{R} = \text{CH}_3-$ ,  $\text{X} = \text{dT}$

(V)  $\text{R} = \text{CH}_3-$ ,  $\text{X} = \text{d}(\text{TrTrT})$

Ms — мезитилен-

Вторым способом было взаимодействие O-алкилгидроксиламинов со смешанным ангидридом мезитиленкарбоновой кислоты и моно- или олигонуклеотида аналогично описанному синтезу амидов нуклеотидов [4] (метод 2).

Как и следовало ожидать, исходя из низкой основности O-алкилгидроксиламинов ( $\text{pK}_a$  4—5), в случае применения дициклогексилкарбодии-

Таблица 1

## Характеристики нуклеотидил-(5'→N)-О-алкилгидроксиламинов

Соединение	Метод синтеза	Выход, %	R <sub>f</sub> в системах		U <sub>отн.</sub> АМР	Соотношение нуклеотид:О-алкилгидроксиламин
			А	Б		
(I)	1	60	0,59	0,63	0,53	1:0,82
	2	40				
(II)	1	60	0,49	0,45	0,38	1:0,80
	2	50				
(III)	2	40	0,62	0,37	0,50	1:1,93
(IV)	2	60	0,56	0,61	0,55	—
(V)	2	50	0,27	0,30	0,82	—

Таблица 2

Условия расщепления фосфоамидной связи в C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>ONpA (I)

Условия реакции	Продукты расщепления	Условия реакции	Продукты расщепления
0,01 н. HCl, 15 мин, 20°	pA	3% формалин, 1 сут, 20°	pA
2 М NH <sub>2</sub> OH, pH 4,6; 60 мин	pA	Ацетон — 0,01 М NH <sub>4</sub> Cl (1:1), pH 7,5; 1 сут	pA (60%) и C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> ONpA (40%)
Пиридин — вода (1:1), 2 сут, 20°	pA	Ацетон — морфолин (1:2), 2 сут, 20°	O(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NpA
Пиридин — этанол (1:1), 4 сут, 37°	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OpA (40%) и pA (60%)	Бензальдегид — морфолин (1:2), 2 сут, 20°	O(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NpA

мида реакция проходила с более высокими выходами по сравнению с методом смешанных ангидридов (табл. 1).

Поскольку в обоих вариантах синтеза время реакции достаточно длительно, нельзя было исключить возможность взаимодействия О-замещенного гидроксиламина с адениновым ядром [5]. Однако УФ-спектры соединений (I)—(III) были идентичными спектрам исходного АМР при разных значениях pH, что свидетельствовало об отсутствии модификации основания. В продуктах мягкого кислотного гидролиза алкоксиамидов (I)—(V) обнаружены только RONH<sub>2</sub> и соответствующий нуклеотид в близких к молярным соотношениях, что также подтверждало их строение.

Алкоксиамиды нуклеотидов оказались довольно устойчивы в нейтральных водных растворах. Так, алкоксиамид (I) имеет τ/2 5 сут при pH 7,5 (0,004 М фосфатный буфер), τ/2 соединения (II) в тех же условиях — 4 сут, а соединения (III) — 2 сут. Подобно амидам мононуклеотидов алкоксиамиды претерпевали гидролиз в кислых водных растворах или в 2 М растворе гидроксиламина [6]. Однако изучение кислотного гидролиза показало, что фосфоамидная связь в алкоксиамидах более лабильна, чем в амидах нуклеотидов. Соединения (I)—(V) гидролизуются полностью до нуклеотидов 0,01 н. HCl в течение 15 мин при 20°. Аденилил-(5' → N)-бензиламин в этих условиях гидролизуеться лишь на 40%.

Были найдены условия, в которых различия в реакционной способности амидов и алкоксиамидов становились значительными (табл. 2).

Алкоксиамиды гораздо легче, чем фосфоамиды, активировались такими нуклеофильными агентами, как пиридин. Так, инкубация алкоксиамида (I) в водном пиридине и смеси пиридина со спиртом в течение 2—4 сут при-

водила соответственно к АМР или этиловому эфиру АМР, в то же время  $C_6H_5CH_2NHpA$  в этих условиях был устойчив.

Второй тип активации Р—N-связи наблюдался под влиянием карбонильных соединений. Соединение (I) в 3% растворе формальдегида (рН 6,5) через 24 ч полностью гидролизовался до АМР. Аналогичная, но более медленная реакция происходила и в водном ацетоне. Бензиламид АМР и в этих условиях был стабилен. Наконец, инкубация бензилоксиамида (I) со смесью ацетона или бензальдегида и морфолина через сутки приводила к морфолиду АМР. Можно думать, что механизмы приведенных выше превращений качественно аналогичны известным реакциям амидов фосфорной кислоты [3, 7].

Таким образом, специфическая активация Р—N-связи в алкоксиамидах нуклеотидов может найти применение в ингибиторном анализе ферментов фосфорного обмена, в качестве фосфорилирующих агентов, а также для обратимой иммобилизации нуклеиновых кислот.

### Экспериментальная часть

Для БХ (бумага FN1 и FN17, ГДР) и ТСХ (пластинки «Silufol», ЧССР) использовались системы: А — этанол — 1 М ацетат аммония (7 : 3), рН 7,5; В — изопропанол — конц. аммиак — вода (7 : 1 : 2). Электрофорез (бумага FN 17) проводили на приборе Savant Instrument Inc. (США) в течение 1 ч при напряжении 2500 В в 0,05 М триэтиламмонийбикарбонатном буфере, рН 7,5.

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Spesord UV-VIS (ГДР).

В работе использовали пиридоксаль-5'-фосфат фирмы Reanal (Венгрия). О-Метилгидроксиламин, О-бензилгидроксиламин и тетраметилендигидроксиламин были получены по описанным методам [8, 9]. Смешанный ангидрид АМР и мезитиленкарбоневой кислоты, бензиламид АМР, морфолид АМР и этиловый эфир АМР получали по методике работы [4].

Количественное определение О-алкилгидроксиламинов осуществляли согласно [9].

*Синтез аденилил-(5' → N)-О-алкилгидроксиламинов. Метод 1.* К водному раствору 0,2 ммоль/АМР ( $H^+$ -форма, 64 мг) добавляли спиртовой раствор три-*n*-октиламина (0,2 ммоль, 0,1 мл). Смесью упаривали и высушивали многократной отгонкой с абс. бензолом. Остаток растворяли в 0,5 мл абс. диметилформамида и добавляли 0,2 мл О-алкилгидроксиламина и 445 мг (2 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Через 5 дней реакционную смесь разбавляли водой (1 мл), экстрагировали эфиром ( $3 \times 2$  мл), водный слой упаривали до небольшого объема и хроматографировали на бумаге в системе А. Выход алкоксиамидов определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент экстинкции для АМР и алкоксиамидов  $\epsilon_{259} 15\ 300$ .

*Метод 2.* К 0,2 ммоль  $MsOPa$  прибавляли 0,2 мл О-алкилгидроксиламина в 0,5 мл абс. диметилформамида (соединение (I)) или в 0,5 мл воды (соединения (II) и (III)). Через 3 сут реакционную смесь разбавляли водой (1 мл), промывали эфиром и разделяли БХ в системе А.

*Количественное определение О-алкилгидроксиламинов.* 50Е ( $\sim 0,3$  мкмоль)  $RONHrA$  гидролизвали 0,01 н.  $HCl$  (15 мин,  $20^\circ$ ). Гидролизат упаривали досуха и прибавляли 5 мл 0,05 М ацетатного буфера (рН 6,5), содержащего 1 мкмоль пиридоксаль-5'-фосфата (ПДФ). Раствор выдерживали 10 мин в темноте. Концентрацию ПДФ измеряли спектрофотометрически до реакции с О-алкилгидроксиламином и после ( $\lambda_{max} 388$  нм,  $\epsilon_{max} 4900$ ). Соотношения нуклеотид: О-алкилгидроксиламин приведены в табл. 1.

В экспериментах по исследованию устойчивости алкоксиамидов нуклеотидов (табл. 2) использовали растворы с концентрацией нуклеотидного

материала  $\sim 10^{-3}$  моль/л. После инкубации  $\text{RONHrA}$  в определенных условиях отбирали пробы, ударивали их и хроматографировали в системах *A* и *B*. Соотношение продуктов реакции определяли спектрофотометрически.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Moffat J. G., Khorana H. G. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 649—663.
2. Khomutov R. M., Karpeisky M. Ya., Severin E. S. (1962) *Proceedings of the Symposium on Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis*, pp. 313—321, Rome.
3. Jencks W. P., Gilchrist M. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 3199—3209.
4. Shumyantzeva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. (1976) *Nucleic Acids Res.*, **3**, 903—916.
5. Budowsky E. I., Sverdlov E. D., Monastyrskaya C. S. (1969) *J. Mol. Biol.*, **44**, 205—207.
6. Рябова Т. Н., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1965) *Докл. АН СССР*, **162**, 1068—1070.
7. Jencks W. P., Gilchrist M. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 1410—1417.
8. Хомутов Р. М. (1961) *Ж. общей химии*, **31**, 1992—1995.
9. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. (1976) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, **5**, 1136—1141.

Поступила в редакцию  
10.V.1977

### SYNTHESIS AND PROPERTIES OF NUCLEOTIDE DERIVATIVES OF HYDROXYLAMINES

SHUMYANTZEVA V. V., KHOMUTOV R. M.

*Institute of Molecular Biology,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The synthesis has been performed of earlier unknown nucleotidyl-(5'  $\rightarrow$  N)-O-alkylhydroxylamines  $\text{RONHrX}$ , where  $\text{R} = \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-$ ,  $\text{CH}_3-$ ,  $\text{NH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_n-$ , and  $\text{X} = \text{A}$ ,  $\text{dT}$ , or  $\text{dTpTpT}$ . The conditions for cleavage of the phosphorus-nitrogen bond in the prepared compounds were investigated. In the presence of nucleophilic (pyridine) or electrophilic agents (carbonyl compounds) the nucleotide alkoxyamidates were shown to possess a phosphorylating activity.

---