



УДК 547.963

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВИРУЮЩИХ АГЕНТОВ ДЛЯ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ 3'-АЗИДО-3'-ДЕЗОКСИТИМИДИНА [³²P]ОРТОФОСФОРНОЙ КИСЛОТОЙ

© 2005 г. Д. В. Январёв^{*#}, Е. А. Широкова^{*}, Ю. С. Скоблов^{**}

^{*}Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

^{**}Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 27.12.2004 г. Принята к печати 10.02.2005 г.

Изучена динамика реакции фосфорилирования AZT [³²P]ортофосфорной кислотой в присутствии различных активирующих агентов. Наиболее эффективным оказался метод с использованием BrCN, позволяющий выделить целевой 3'-азидо-3'-дезокситимидин-[5'-³²P]монофосфат с выходом 46% и высокой молярной радиоактивностью (>100 Ки/ммоль).

Ключевые слова: 3'-азидо-3'-дезокситимидин монофосфат, фосфорилирование, синтез ³²P-меченых нуклеотидов, [³²P]ортофосфорная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Нуклеотиды, меченные радиоактивными изотопами фосфора, используют в биологических исследованиях более 30 лет, и основные достижения в структурно-функциональных исследованиях нуклеиновых кислот, молекулярной генетике и биотехнологии невозможно себе представить без широкого применения этих соединений.

Самыми востребованными мечеными нуклеотидами оказались [γ -³²P]АТФ и предшественники биосинтеза нуклеиновых кислот, меченные фосфором в α -положении, поэтому первоначально основные усилия были сосредоточены на разработке различных методов синтеза именно этих соединений [1]. Однако после работы Джонсона и Валсеса простой и удобный ферментативный синтез нуклеотидов, меченных радиоактивными изотопами фосфора, стал рутинной процедурой (схема) [2].

Согласно этому методу [γ -³²P]АТФ синтезируют из АДФ и радиоактивного ортофосфата ферментами гликолиза с выходом 95–97% за 10–15 мин, причем кроме [γ -³²P]АТФ могут быть синтезированы некоторые другие [γ -³²P](d)NTP из соответствующих нуклеозид-5'-дифосфатов (реакция 1). Синтез [5'-³²P](d)NMP осуществляется с помощью Т4 полинуклеотидкиназы из [γ -³²P]АТФ и соответствующего дезоксинуклеозид-3'-фосфата (реакция 2) с последующим дефосфорилированием 3'-

фосфата нуклеазой Р1 (реакция 3). Основным недостатком всего метода проявляется именно в реакции 2: специфичность Т4 полинуклеотидкиназы существенно ограничивает число соединений, которые могут являться субстратами для этого фермента. В частности, 3'-замещенные 2'-дезоксинуклеотиды или 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидропроизводные не могут быть синтезированы этим методом.

Исследования биохимии и метаболизма синтетических аналогов нуклеотидов удобнее и проще проводить с помощью меченых соединений, поэтому разработка методов их синтеза является актуальной радиохимической задачей. В настоящей работе мы приводим несколько не описанных ранее химических методов получения 3'-азидо-3'-дезокситимидин-[5'-³²P]монофосфата (I) путем фосфорилирования 3'-азидо-3'-дезокситимидина (AZT) [³²P]ортофосфорной кислотой в присутствии различных конденсирующих агентов и сравниваем их эффективность, анализируя динамику реакций, а также качественный и количественный состав побочных продуктов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее удобным методом получения нерадиоактивных нуклеозидмонофосфатов является

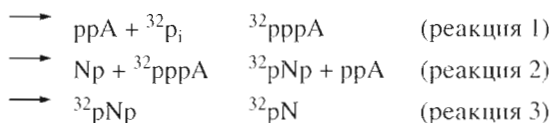
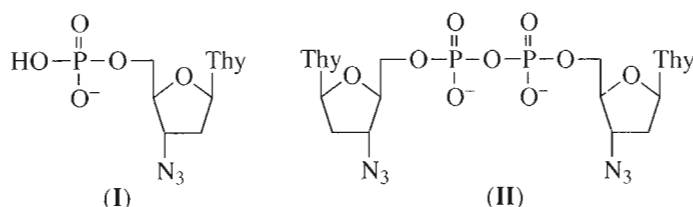


Схема.

Сокращения: AZT – 3'-азидо-3'-дезокситимидин; MCC – N-циклогексил-N-(2-морфолиноэтил)карбодимид метил-п-толуолсульфонат; TCN – трихлорацетонитрил; TPS-Cl – 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорид.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 135-22-55; факс: (095) 135-14-05; эл. почта: vsupport@bk.ru).



фосфорилирование с использованием хлорокиси фосфора. Метод дает высокие выходы продуктов, слабо зависящие от природы нуклеозида [3]. Однако при попытке применить этот подход к радиоактивному синтезу, исследователи столкнулись с рядом трудностей, совокупность которых делает такой подход бесперспективным. В частности, принципиально невозможно получить необходимый фосфорилирующий агент с высокой молярной активностью прямым облучением нерадиоактивного POCl_3 по реакции (n, γ). Метод синтеза $^{32}\text{P}\text{OCl}_3$ на основе ^{32}P ортофосфорной кислоты (основного источника изотопа ^{32}P) и нерадиоактивного пятихлористого фосфора приводит к значительному изотопному разбавлению полученного продукта [4], а невысокие выходы и необходимость работы с летучим радиоактивным веществом полностью сводят на нет выгоды от использования $^{32}\text{P}\text{OCl}_3$ как фосфорилирующего агента в синтезе меченых нуклеотидов.

Поскольку единственным доступным в настоящее время источником радиоактивного фосфора без носителя является ^{32}P ортофосфорная кислота, нашей целью было подобрать активирующий агент для фосфорилирования модифицированных нуклеозидов, который способен обеспечить высокие выходы и минимальный набор радиоактивных примесей. Кроме того, такой агент должен обеспечивать высокую скорость реакции, так как со временем в реакционной смеси накапливаются продукты свободнорадикальных реакций, индуцированных ионизирующим излучением.

В качестве акцептора ^{32}P ортофосфата мы выбрали AZT, чтобы на примере фосфорилирования этого модифицированного нуклеозида, имеющего практическое значение, разработать наиболее эф-

фективный способ синтеза нуклеозид $[5'\text{-}^{32}\text{P}]$ монофосфатов.

Мы использовали несколько конденсирующих агентов, широко применяемых в химии фосфорилирования нуклеозидов: TPS-Cl, водорастворимый карбодимид MCC, DCC и TCN и сравнили выходы целевого монофосфата (I) и составы реакционных смесей в этих реакциях (таблица).

Выбранное нами соотношение реагентов характерно для радиоактивного синтеза, в котором радиоактивная компонента используется в значительном недостатке: к 1 экв. ^{32}P фосфорной кислоты добавляли 100 экв. AZT и 10 экв. соответствующего конденсирующего агента. Столь значительный избыток нуклеозидной компоненты позволяет провести реакцию в условиях, при которых скорость реакции практически не зависит от изменения концентрации AZT, то есть в условиях реакции псевдо первого порядка. В случае применения ВЭЖХ такой избыток AZT не вызывает дополнительных потерь при выделении. Использование 10 эквивалентов конденсирующего агента позволяет значительно повысить воспроизводимость выходов соответствующих реакций за счет нивелирования влияния качества растворителей и реактивов. Реакции проходили в среде абсолютного пиридина при 18°C . Ход реакции и выход продукта оценивали по ТСХ на силикагеле. На рис. 1 представлен радиоавтограф такой пластинки. Точки отобраны в моменты времени, соответствующие максимальным выходам продукта (I) (15 мин для TPS-Cl, 1 ч для TCN, 2.4 ч для DCC и 1.8 ч для MCC).

Хотя выход целевого (I) в реакции с использованием TCN составляет только 15%, это почти на порядок лучше, чем полученный нами в условиях, описанных Симонсом для природных нуклеотидов [5]. Таким образом, замена растворителя (DMSO на пиридин) существенно увеличила выход и снизила количество побочных продуктов.

Как и следовало ожидать, при использовании DCC сравнительно невысокий выход целевого продукта (18%) сопровождается образованием значительного количества бис(азидотимидин)дифосфата (II) и других побочных продуктов, большую часть которых мы не смогли идентифицировать.

Использование водорастворимого карбодимида MCC позволяет увеличить выход продукта

Сравнения выходов монофосфата (I) в присутствии различных конденсирующих агентов

Конденсирующий агент	Содержание компонентов в реакционной массе, %			
	(I)	(II)	Pi	НП*
TPS-Cl	35	4	61	0
TCN	15	0	84	1
DCC	18	50	23	9
MCC	30	26	39	4

* НП – неидентифицированные примеси.

(I) до 30%, однако, доля образующегося в ходе реакции дифосфата (II) велика и составляет 26%.

Несомненными преимуществами обладает синтез с использованием TPS-Cl, который позволяет достичь более высокого выхода целевого продукта (35%) при минимальном количестве примесей. Однако избыток TPS-Cl в реакции затрудняет дальнейшее препаративное выделение продукта с применением ВЭЖХ, особенно при использовании ионообменной хроматографии. Поэтому анализ этой реакционной смеси и препаративное выделение монофосфата (I) мы проводили, используя обращенно-фазовый сорбент и элюцию в ион-парном режиме. В процессе дополнительной хроматографической очистки продукта (I) от 2,4,6-триизопрпилбензолсульфокислоты выход нуклеотида (I) снижается на 7–9% от приведенного в таблице.

Поскольку ни один из изученных конденсирующих агентов не показал высокой эффективности в реакции фосфорилирования AZT, мы исследовали возможность использования в этом качестве BrCN – активирующего агента, который ранее применяли для синтеза олигонуклеотидов [6]. Проведение реакции в присутствии BrCN в условиях, описанных выше для других конденсирующих агентов, невозможно, так как ранее было показано, что в абсолютной среде главным продуктом является дифосфат (II) [6]. Использование *N*-алкилморфолинов нам показалось неприемлемым, поскольку отмеченное авторами в этой работе расщепление третичных аминов под действием BrCN приводит к нецелевому расходованию активирующего агента и накоплению побочных продуктов. Поэтому мы провели реакцию в 2 М водном пиридине и получили монофосфат (I) с выходом 46%. Выход дифосфата (II) составил 4%. Следует отметить, что существенное преимущество BrCN заключается в том, что избыток этого реагента может быть полностью удален упариванием в вакууме, что уменьшает потери при выделении продукта (I) до 1–2%.

Выделение монофосфата (I) с помощью ВЭЖХ не представляет особых проблем, а использование двойной детекции (по радиоактивности и по УФ-поглощению) делает процедуру достаточно рутинной. Для выделения продукта мы также использовали электрофорез в агарозном геле (рис. 2). Хотя нам удалось выделить продукт (I) в гомогенном состоянии, потери при этом достигли 35%, поэтому такой способ выделения не следует считать серьезной конкуренцией ВЭЖХ. Следует отметить, что использование хроматографической бумаги вместо агарозного геля дает плохое разделение продуктов из-за сильного размывания зоны ортофосфата, а замена агарозы на полиакриламид затрудняет извлечение продукта из геля.

Мы сравнили кинетику реакции фосфорилирования AZT в присутствии BrCN и TPS-Cl в пири-

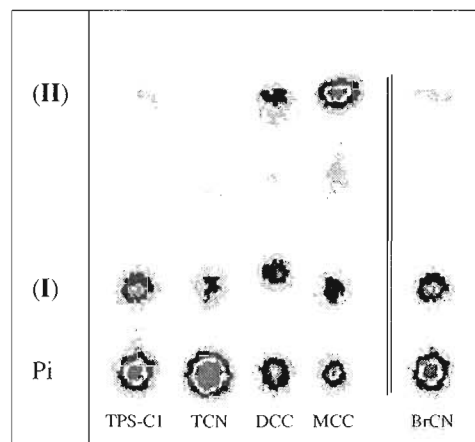


Рис. 1. Радиоавтограф тонкослойной хроматограммы на силикагеле реакционных смесей в системе В (см. “Эксперимент. часть”).

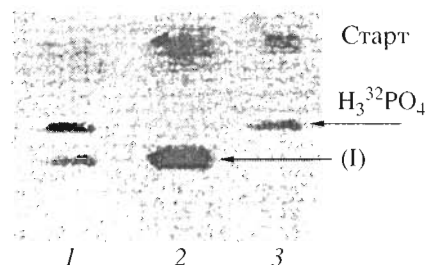


Рис. 2. Радиоавтограф электрофореза реакционной смеси в агарозе. Дорожка 1 – реакционная масса, дорожки 2 и 3 – аутентичные монофосфат (I) и $H_3^{32}PO_4$ соответственно.

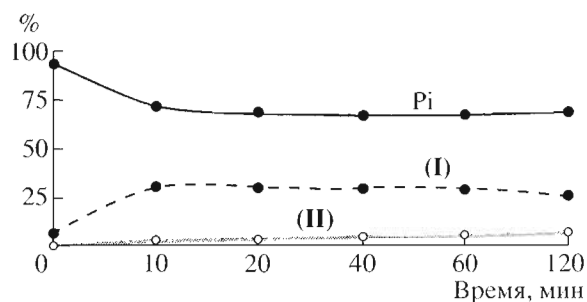


Рис. 3. Динамика реакции фосфорилирования в присутствии TPS-Cl. Pi – содержание неорганического фосфата; (I) – содержание продукта (I); (II) – содержание продукта (II).

дине при 20°C при следующих оптимизированных соотношениях реагентов: 100 экв. AZT, 10 экв. TPS-Cl/ H_3PO_4 (рис. 3); 200 экв. AZT, 100 экв. BrCN/ H_3PO_4 (рис. 4). Анализ аликвот реакционных смесей в этих экспериментах проводили методом ВЭЖХ. Скорости этих реакций различаются, по крайней мере, на порядок. Для реакции с TPS-Cl оптимальное время реакции 10–20 мин, а за-

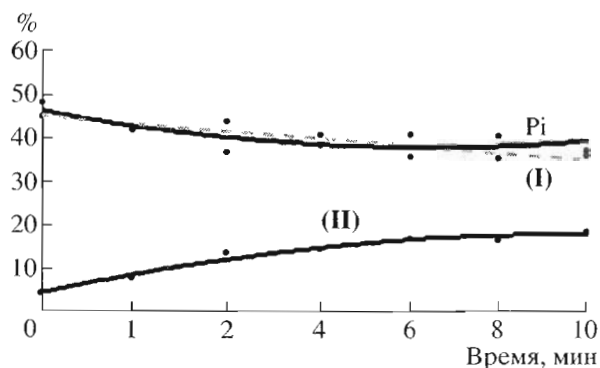


Рис. 4. Динамика реакции фосфорилирования в присутствии BrCN. Pi — содержание неорганического фосфата; (I) — содержание продукта (I); (II) — содержание продукта (II).

тем выход незначительно уменьшается, вероятно, за счет процесса димеризации монофосфата (I).

Скорость реакции в присутствии BrCN столь высока, что в начальной точке, которая реально составляет 10–15 с, наблюдается максимальный выход продукта (I) (46%). При этом количество примесей в этот момент времени минимально. Дальнейшая инкубация снижает выход целевого продукта и увеличивает количество побочных продуктов.

Для определения физико-химических характеристик продуктов реакции мы провели масштабированный синтез, используя ортофосфорную кислоту с низкой молярной радиоактивностью (0.1 Ки/моль).

Таким образом, изучение реакции фосфорилирования AZT [^{32}P]ортофосфорной кислотой показало, что наиболее эффективным активирующим агентом является BrCN. Метод с использованием этого реагента можно рекомендовать для препаративной наработки 3'-азидо-3'-дезокситимидин-[5'- ^{32}P]монофосфата с высокой молярной активностью (>100 Ки/ммоль) и загрузками до 20 МКи по радиоактивному сырью.

Можно отметить, что разработанный нами метод, без каких-либо модификаций, применим также к синтезу нуклеозидмонофосфатов на основе $\text{H}_3^{33}\text{PO}_4$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 5 М BrCN в ацетонитриле (Merck), DCC и TCN (Fluka), MCC и H_3PO_4 (Merck), [^{32}P]ортофосфорная кислота получена из Института реакторных материалов (Заречный, Свердловская обл.), AZT любезно предоставлен ассоциацией АЗТ (Москва).

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1201 (Япония). ^1H -ЯМР-спектры получены на спектрометре Bruker AMX III-400

(400 МГц). ^{31}P -ЯМР-спектры — на том же приборе с рабочей частотой 162 МГц при подавлении фосфор-протонного спин-спинового взаимодействия с 85% H_3PO_4 в качестве внешнего стандарта. ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Gilson (Франция), с УФ-детектором тип 115 и проточным детектором радиоактивности тип 170, используя колонку (4 × 150 мм) Lichrosorb RP-18 (5 мкм), с градиентной элюцией в ион-парном режиме. Раствор А: 50 мМ ТЕАВ, раствор В: 75% этанол, скорость элюции 0.5 мл/мин. Элюция по программе: 0–5 мин (0% В), 5–10 мин (0 → 20% В), 10–30 мин (20 → 30% В). Время удерживания соединения (I) — 14 мин, AZT — 20 мин, дифосфата (II) — 23 мин. Для ТСХ использовали пластинки Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) и элюирующие системы хлороформ–метанол 9 : 1 (система А), диоксан–*n*-PrOH–вода–25% водный NH_3 3 : 3 : 3 : 1 (система В). Детектирование радиоактивных продуктов реакции проводили автордиографически и с помощью Instant Imager electronic autoradiography (Packard Instrument Company, США). Количественный анализ реакционных смесей на пластинках ТСХ осуществляли на этом же приборе с использованием прилагаемого программного обеспечения.

Электрофорез выполняли в камере для горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле (60 × 30 мм), толщина геля 3–4 мм, электродный буфер 20 мМ однозамещенный фосфат натрия (рН 4.3). Напряжение 400 В, время разделения 10–12 мин. Выделение целевого продукта (I) проводили замораживанием геля при -18°C с последующим оттаиванием и отбором слоя жидкости. Соединения идентифицировали методом ВЭЖХ в условиях, описанных выше.

Общая методика синтеза монофосфата (I) при активации TPS-Cl, TCN, DCC, MCC. Раствор 10 МКи $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ в 0.05 М HCl (20–50 мкл в зависимости от объемной активности $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$) вносили в 10 мкл 10 мМ водного раствора фосфорной кислоты (100 нмоль), растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в 50% водном пиридине, раствор упаривали досуха и дважды переупаривали с абсолютным пиридином (2 × 20 мкл). Полученный остаток растворяли в 20 мкл абсолютно-го пиридина, добавляли 10 мкл 1 М раствора AZT (10 кмоль) в абсолютном пиридине и 10 мкл 0.1 М раствора соответствующего конденсирующего агента в пиридине. По окончании реакции (детекция ТСХ), растворитель удаляли в вакууме, остаток дважды соупаривали с 50 мкл воды, растворяли в 50 мкл воды и продукт (I) выделяли с помощью ВЭЖХ. Выходы продукта (I): 28% в случае TPS-Cl (после рехроматографии), 15% в случае TCN, 18% в случае DCC, 30% в случае MCC. Молярная радиоактивность 100 Ки ммоль⁻¹. ^1H -ЯМР (D_2O ; δ , м.д.; *J*, Гц): 7.43 (1 H, д, *J* 1, H₆), 6.27 (1 H, т, *J* 7.5, H_{1'}), 4.4 (1 H, м, H_{3'}), 4.2 (2 H, м,

H5'), 4.07 (1 H, м, H4'), 2.25 (2 H, м, H2'), 1.88 (3 H, д, J 1, 5-CH₃). ³¹P-ЯМР (D₂O): 0.54 с.

ЯМР-спектры приведены для образца соединения (I) с молярной радиоактивностью 0.1 Ки моль⁻¹.

Синтез монофосфата (I) при активации BrCN.

Раствор 10 мКи H₃³²PO₄ в 0.05 М HCl (20–50 мкл в зависимости объемной активности) вносили в 10 мкл 1 мМ раствора H₃PO₄, растворители удаляли в вакууме, остаток растворяли в 50% водном пиридине (20 мкл), растворители удаляли в вакууме, остаток растворяли в 2 М водном пиридине (15 мкл), далее добавляли 10 мкл 2 М раствора AZT (20 мкмоль) в 2 М водном пиридине, затем вносили 2 мкл 5 М раствора BrCN в абсолютном ацетонитриле. По окончании реакции растворитель удаляли в вакууме, остаток дважды соупаривали с 50 мкл воды, растворяли в 50 мкл воды и продукт (I) выделяли с помощью ВЭЖХ. Выход составил 46%. Молярная радиоактивность 100 Ки/ммоль.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 04-03-32481, 04-04-49617 и 05-04-49500) и Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скоблов Ю.С., Королев А.Э., Маслова Р.Н. // Успехи химии. 1995. Т. 64. С. 850–858.
2. Walseth T.F., Johnson R.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 526. P. 11–16.
3. Turcotte J.G., Pivarnik P.E., Shirali S.S. // J. Chromatography. 1990. V. 499. P. 55–61.
4. Suesy P., Zagarny M. // Chem. Phys. Lipids. 1969. V. 56. P. 9–13.
5. Symons R.H. // Methods Enzymology. 1974. V. 29. P. 102–108.
6. Fedorova O.A., Gottikh M.B., Oretskaya T.S., Shabarova Z.A. // Nucleosides Nucleotides. 1996. V. 15. P. 1137–1147.

The Study of Coupling Agents for the Phosphorylation of 3'-Azido-3'-deoxythymidine with [³²P]Orthophosphoric Acid

D. V. Yanvarev^{##}, E. A. Shirokova^{*}, and Yu. S. Skoblov^{**}

[#]Fax: (095) 135-1405; phone: (095) 135-2255; e-mail: vsupport@bk.ru

^{*}Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

^{**}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

The kinetics of 3'-azido-3'-deoxythymidine phosphorylation with [³²P]orthophosphoric acid was studied in the presence of various coupling agents. The most effective method with the use of BrCN provided the isolation of the target 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-[³²P]monophosphate in 46% yield and a high specific radioactivity (>100 Ci/mmol). The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-monophosphate, [³²P]orthophosphoric acid, phosphorylation, synthesis of ³²P-labeled nucleotides