



УДК 547.96.3 : 542.953

ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И НУКЛЕОТИДОПЕПТИДЫ

XXVI. СИНТЕЗ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ НУКЛЕОТИДИЛ-
И ОЛИГОНУКЛЕОТИДИЛ-(5' → N)-АМИНОКИСЛОТ (ПЕПТИДОВ) *Юодка Б., Лиоранчайте Л., Янушоните Л.,
Саснаускене С.

Вильнюсский государственный университет

Обсуждаются методы синтеза нуклеотидил- и олигонуклеотидил-(5' → N)-аминокислот (пептидов). Отработаны условия синтеза сложных эфиров нуклеотидил- и олигонуклеотидил-(5' → N)-аминокислот с помощью дициклогексилкарбодимида в абсолютных и водных органических растворителях. Впервые для синтеза нуклеотидопептидов с фосфоамидной связью между фрагментами применен карбонилдимидазол.

Нуклеотидил- и олигонуклеотидил-(5' → N)-аминокислоты (пептиды), простейшие модели ковалентного связывания белков и нуклеиновых кислот, нашли широкое применение для изучения взаимодействия этих природных полимеров [1,2], а также для матричного синтеза олигонуклеотидов [3]. В настоящее время известен ряд методов синтеза сложных эфиров нуклеотидил-(5' → N)-аминокислот [4—9]. Чаще всего для активации фосфорного остатка нуклеотидов применяют хлорангидриды диэфиров фосфорной кислоты [5,9] и дициклогексилкарбодимид [6,8]. Особенно хорошие выходы дает кипячение нуклеотидов, сложных эфиров аминокислот и дициклогексилкарбодимида в смеси *трет*-бутилового спирта и воды (2 : 1) [8]. По ряду причин указанные методы недостаточно удобны для синтеза олигонуклеотидных аналогов. Так, например, дифенилхлорфосфат активирует не только 5'-концевой фосфат, но и межнуклеотидный фосфор олигонуклеотидов [10]. Недавно показано [11], что с помощью этого реагента можно добиться количественных выходов олигонуклеотидил-(5' → N)-амидов, однако полностью избежать активации межнуклеотидного фосфора не удастся. Синтез сложных эфиров нуклеотидил- и олигонуклеотидил-(5' → N)-аминокислот с помощью дициклогексилкарбодимида в абсолютном диметилформамиде при комнатной температуре идет долго и дает целый ряд побочных продуктов [6].

Настоящая работа посвящена подбору оптимальных условий синтеза сложных эфиров нуклеотидил- и олигонуклеотидил-(5' → N)-аминокислот с помощью дициклогексилкарбодимида в органических растворителях и в смеси *трет*-бутилового спирта и воды (2 : 1). Предложен новый метод синтеза аминокислотных производных нуклеотидов и олигонуклеотидов с использованием карбонилдимидазола.

* Сообщение XXV — см. «Биоорганич. химия», 2, с. 1318—1324.

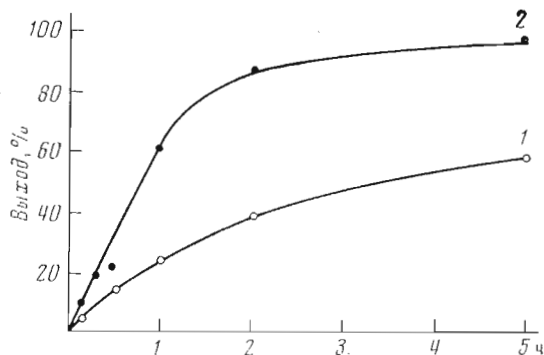


Рис. 1. Кинетика синтеза D,L -MeO-Phe-pU (I) по методу А в абс. диметилформамиде при 20° (1) и 44° (2)

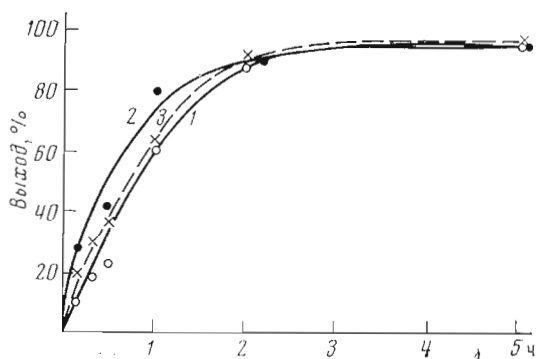


Рис. 2. Кинетика синтеза D,L -MeO-Phe-pU (I) по методу А в абс. диметилформамиде (1), диоксане (2) и пиридине (3) при 44°

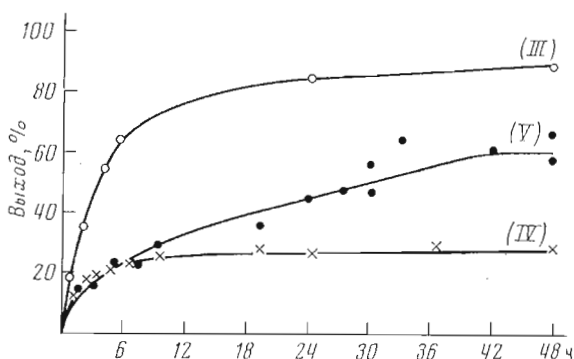


Рис. 3. Кинетика синтеза D,L -MeO-Phe-pA (III) (44°), D,L -MeO-Phe-pC (IV) (60°) и D,L -MeO-Phe-pG (V) (60°) в абс. диметилформамиде по методу А

Метилловые эфиры уридил- $(5' \rightarrow N)$ - D,L -фенилаланина (I) и уридил- $(5' \rightarrow N)$ - L -гистидина (II) синтезировали по ранее описанному методу [6]. Реакционная смесь помимо эфиров уридил- $(5' \rightarrow N)$ -аминокислот (40–50%) содержала три побочных продукта. Увеличение количества аминокислотного компонента с трех- до 15-кратного избытка по отношению к нуклеотиду увеличивает выходы до 73%. На выход продуктов реакции влияет также повышение температуры. Так, повышение температуры с 20 до 44° увеличило выход метилового эфира (I) на 40% и сократило продолжительность реакции до 3 ч (рис. 1).

Для изучения влияния природы органических растворителей на выход метилового эфира (I) использовали абсолютные диоксан, пиридин и диметилформамид. Оказалось, что характер растворителя практически не влияет на выход продуктов реакции. Во всех трех растворителях через 3 ч в реакционной смеси обнаружено лишь соединение (I) (рис. 2).

Эти результаты мы использовали для синтеза метиловых эфиров аденилил-(5' → N)-*D,L*-фенилаланина (III), цитидилил-(5' → N)-*D,L*-фенилаланина (IV) и гуанилил-(5' → N)-*D,L*-фенилаланина (V) (рис. 3). УФ-спектры и электрофоретическая подвижность соединений (III) — (V) показывают, что аминогруппы аденина, цитозина и гуанина в реакцию не вступают (см. таблицу). Из-за плохой растворимости триоктиламмониевых солей цитидиловой и гуаниловой кислот в абсолютном диметилформамиде и образования в реакционной смеси небольших количеств симметричных пиродифосфатов этих нуклеотидов выходы соединений (IV), (V) ниже, чем в случае адениловых и уридилловых аналогов. Для улучшения растворимости цитидиловой и гуаниловой кислот в органических растворителях рекомендуется использовать их *N*-ацильные производные.

Отработанные оптимальные условия (метод А) (44°, 24 ч) применили для синтеза этилового эфира *N*-анизоилдезоксцитидилил-(5' → 3')-тимидилил-(5' → N)-*D,L*-фенилаланина (VI), метиловых эфиров *N*-анизоилдезоксцитидилил-(5' → 3')-*N*-анизоилдезоксцитидилил-(5' → N)-*L*-гистидина (VII) и тимидилил-(5' → 3')-тимидилил-(5' → N)-*L*-гистидина (VIII). Выходы этих соединений достигают 55%. Межнуклеотидная связь в условиях реакции устойчива.

Сравнительно невысокие выходы соединений (VI) — (VIII) заставили нас искать другие методы активации остатка фосфорной кислоты в нуклеотидах и олигонуклеотидах. При синтезе некоторых нуклеотидных производных для этой цели был использован карбонилдимидазол [12, 13]. Мы применили этот агент в пятикратном избытке для синтеза сложных эфиров нуклеотидил- и олигонуклеотидил-(5' → N)-аминокислот. Такой избыток карбонилдимидазола использовали и другие авторы при синтезе нуклеозиддифосфатов [13]. Предварительные результаты нашей работы опубликованы ранее [9]. За образованием имидазолидов следили с помощью хроматографии на бумаге и по положительной реакции Паули. Их количество определяли спектрофотометрически. Как видно из рис. 4, синтез имидазолидов сильно зависит от природы нуклеотида. Если за 1 ч (40°) получаются уридил- и аденил-(5' → N)-имидазолиды с 90 и 75% выходом соответственно, то выход гуаниловых и цитидиловых имидазолидов в таких же условиях достигает лишь 50%, по-видимому, из-за плохой растворимости в диметилформамиде триоктиламмониевых солей цитидиловой и гуаниловой кислот. Аминогруппы аденина, цитозина и гуанина не принимают участия в реакции с карбонилдимидазолом (ср. [13]). К полученным имидазолидам нуклеотидов и динуклеотидов, не выделяя их из реакционной смеси, прибавляли 10—15-кратный избыток сложных эфиров аминокислот (пептидов) и нагревали при 40—50°. Выход продуктов реакции определяли спектрофотометрически по отношению к непрореагировавшим имидазолидам нуклеотидов. В случае некоторых соединений исследовали кинетику реакции (рис. 5).

Этим методом с выходами 40—90% были получены этиловые эфиры уридил-(5' → N)-*D,L*-валина (IX), уридил-(5' → N)-*D,L*-аланил-*D,L*-лейцина (X) и соединения (III), (V), (VII) и (VIII). На примере реакции триоктиламмониевой соли тимидилил-(3' → 5')-тимидина с карбонилдимидазолом показано, что межнуклеотидный фосфор в реакции не участвует, т. е. карбонилдимидазол является специфическим активатором концевых фосфатных групп нуклеотидов и олигонуклеотидов. Однако выходы олигонуклеотидил-(5' → N)-аминокислот невысокие.

Недавно мы показали [8], что кипячение нуклеотидов со сложными эфирами аминокислот (пептидов) и дидецилогексилкарбодимидом в смеси

Некоторые характеристики эфиров нуклеотидил-(5' → N)-аминокислот

Соединение	Выход, %			УФ-поглощение в воде (рН 6), нм		R _f в системах		E _f		Основание — фосфор — аминокислота
	Метод А	Метод Б	Метод В	λ _{макс}	λ _{мин}	A B		рН 3,5	рН 7,5	
						B A				
<i>D, L</i> -MeO-Phe-pU (I)	98			261	230	0,71	0,49	1,00	0,50	1 : 0,87 : 0,79
<i>L</i> -MeO-His-pU (II)	86			261	230	0,70	0,50		0,45	1 : 0,91 : 0,84
<i>D, L</i> -MeO-Phe-pA (III)	90	75		259	227	0,60	0,45	0,82	0,42	1 : 0,81 : 0,87
<i>D, L</i> -MeO-Phe-pC (IV)	70	80		271	250	0,51	0,42		0,46	1 : 0,83 : 0,90
<i>D, L</i> -MeO-Phe-pG (V)	68	40		252	224	0,48		0,87	0,43	1 : 0,78 : 0,81
<i>D, L</i> -EtO-Phe-d(pTranC) (VI)	30	50				0,47			0,63	
<i>L</i> -MeO-His-d(panCranC) (VII)	40	40				0,50			0,80	
<i>L</i> -MeO-His-d(pTrT) (VIII)	55	45				0,38				
<i>D, L</i> -MeO-Val-pU (IX)		90				0,69	0,50			1 : 0,93 : 0,79
<i>D, L</i> -EtO-Leu- <i>D, L</i> -Ala-pU (X)		60	60			0,70	0,53			
<i>D, L</i> -EtO-Ala-d(pApA) (XI)			50						0,75	
<i>D, L</i> -EtO-Ala-d(pApApA) (XII)			85						0,75	
<i>D, L</i> -EtO-Ala-d(pTrT) (XIII)						0,24	0,41			

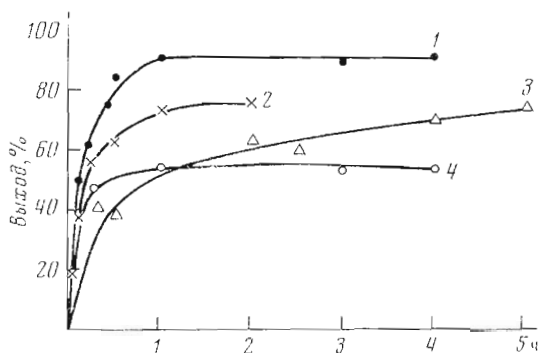


Рис. 4. Кинетика синтеза уридилаил- (1), аденилил- (2), гуанилил- (3) и цитидилил-(5' → N)-имидазолидов (4) (40°, абс. диметилформамид)

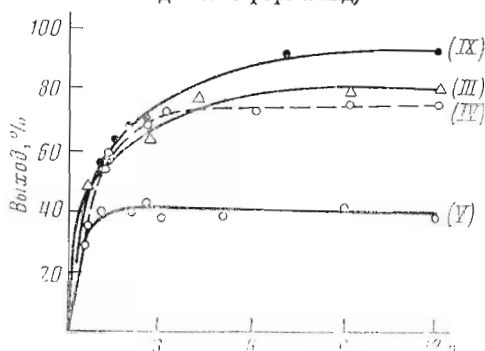


Рис. 5. Кинетика синтеза *D,L*-MeO-Phe-pA (III), *D,L*-MeO-Phe-pC (IV), *D,L*-MeO-Phe-pG (V) и *D,L*-MeO-Val-pU (IX) по методу Б

трет-бутилового спирта и воды (2 : 1) приводит к нуклеотидиламинокислотам с хорошими выходами. Мы применили этот метод (метод В) для синтеза этилового эфира дезоксиаденилил-(5' → 3')-дезоксиаденилил-(5' → N)-*D,L*-аланина (XI). Контрольный опыт, проведенный только с d (pArA), показал, что межнуклеотидная связь устойчива в условиях реакции. Аналогичным образом были синтезированы этиловые эфиры дезоксиаденилил-(5' → 3')-дезоксиаденилил-(5' → 3')-дезоксиаденилил-(5' → N)-*D,L*-аланина (XII) и тимидилил-(5' → 3')-тимидилил-(5' → N)-*D,L*-аланина (XIII) с выходами 50 и 85% соответственно.

Некоторые характеристики синтезированных соединений приведены в таблице.

Экспериментальная часть

В работе использовали динатриевые соли уридин-5'-фосфата, цитидин-5'-фосфата, аденозин-5'-фосфата, гуанозин-5'-фосфата и хлоридраты сложных эфиров аминокислот (Reanal, Венгрия), карбоилдимидазол (Fluka, Швейцария), дициклогексилкарбодимид (Feraк, ФРГ).

Эфиры нуклеотидил- и олигонуклеотидил-(5' → N)-аминокислот (пептидов) выделяли с помощью препаративной хроматографии на бумаге марки FN-1, FN-17 (быстрая, ГДР). Для аналитических целей применяли ТСХ на пластинках Silufol (ЧССР). Использовали следующие системы растворителей: этиловый спирт — 1 М уксуснокислый аммоний, 7 : 3 (А); изопропиловый спирт — конц. аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (Б); хлороформ — этиловый спирт, 9 : 1 (В). Электрофорез на бумаге проводили в 0,05 М три-

этиламмонийбикарбонатном буфере, рН 7,5, и в 0,05 М ацетатном буфере, рН 3,6. Использовали вертикальный высоковольтный прибор фирмы Labor (Венгрия). УФ-спектры регистрировали с помощью спектрофотометра СФ-16. Структуру сложных эфиров пуклеотидил-(5' → N)-аминокислот доказывали определением отношения основание — фосфор — аминокислота после полного кислотного гидролиза (6 н. HCl, 100°, 24 ч) [14]. Имидазолиды нуклеотидов вступали в реакцию Паули и после кислотного гидролиза давали нуклеотиды и имидазол.

Олигонуклеотиды синтезировали методами [15]. 5'-Фосфотимидилл-(3' → 5')-N-анизоилдезоксцитидин и 5'-фосфо-N-анизоилдезоксцитидилл-(3' → 5')-N-анизоилдезоксцитидин нам любезно предоставил сотрудник МГУ В. Д. Смирнов.

Метиловый эфир уридилл-(5' → N)-D,L-фенилаланина(I). Метод А. Уридин-5'-фосфат (20,2 мг, 0,05 ммоль динатриевой соли) пропускали через колонку с дауэксом-50 (H⁺-форма), водный раствор упаривали до небольшого объема, добавляли триоктиламин (0,05 ммоль), встряхивали, упаривали досуха и растворяли в абс. диоксане. Прозрачный раствор снова упаривали досуха и остаток высушивали многократной азеотропной отгонкой с безводным диоксаном, остаток растворяли в 0,5 мл безводного диоксана, диметилформамида или пиридина, добавляли метиловый эфир D,L-фенилаланина (90 мг, 0,5 ммоль), дидиклогексилкарбодимид (61,8 мг, 0,3 ммоль) и инкубировали при 44° (см. рис. 1). Препаративное выделение соединения проводили с помощью БХ в системе Б. Полосу с R_f 0,49 элюировали водой и вещество характеризовали, определив отношение уридил — фосфор — фенилаланин, а также установив хроматографическую и электрофоретическую подвижности (см. таблицу).

Аналогичным образом синтезировали эфиры (II), (III) — (VIII). Реакции проводили 24 ч при 44° в случае соединения (III) и при 60° в случае соединений (IV), (V). Некоторые характеристики соединений (I) — (VIII) приведены в таблице.

Для кинетических исследований из реакционной смеси через определенные промежутки времени отбирали пробы и хроматографировали на бумаге в системе Б. Выход определяли спектрофотометрически после элюирования 0,1 н. HCl. На рис. 1 приведена кинетика синтеза эфира (I) при 20 и 44°. Зависимость выхода соединения (I) от природы растворителя представлена на рис. 2, а от строения нуклеинового основания — на рис. 3.

Метиловый эфир уридилл-(5' → N)-D,L-валина (IX). Метод Б. 0,1 ммоль триоктиламмониевой соли уридин-5'-фосфата растворяли в 0,5 мл абс. диметилформамида, прибавляли 80 мг (0,5 ммоль) карбонилдиимидазола и выдерживали 1 ч при 40°. К образовавшемуся уридилл-(5' → N)-имидазолу прибавляли 131 мг (1,0 ммоль) метилового эфира D,L-валина в 0,5 мл абс. диметилформамида и нагревали при 40°.

Кинетику синтеза эфиров по методу Б изучали аналогично описанному для метода А. Результаты исследования представлены на рис. 5. Через 10 ч соединение (IX) выделяли с помощью БХ в системе Б. Полосу с R_f 0,5 элюировали водой. Выход эфира (IX) — 90%.

Аналогичным образом с выходами 40—70% синтезировали соединения (III), (V), (VII), (VIII), (X). Некоторые характеристики синтезированных соединений приведены в таблице.

Кинетика образования нуклеотидил-(5' → N)-имидазолидов. 0,1 ммоль динатриевых солей нуклеозид-5'-монофосфатов переводили в триоктиламмониевые соли и растворяли в 0,5 мл абс. диметилформамида. К полученным растворам прибавляли 0,15 или 0,5 ммоль карбонилдиимидазола и инкубировали при 40°. Из реакционных смесей отбирали пробы и после БХ в системе Б спектрофотометрически определяли выходы имидазолидов в каждой пробе. Оптимальная продолжительность реакции 1 ч для аденил-, цитидил- и уридилл-(5' → N)-имидазолидов и 8 ч для гуанилового аналога (см. рис. 4). Нуклеотидил-(5' → N)-имидазолиды давали

положительную реакцию Паули. Полученные соединения лабильны и легко распадаются до имидазола, нуклеотидов и симметричных пирофосфатов нуклеотидов.

Этиловый эфир дезоксиаденилил-(5' → 3')-дезоксиаденилил-(5' → N)-D, L-аланина (XI). Метод В. 550 ОЕ (~ 1 мкмоль) 5'-фосфодезоксиаденилил-(3' → 5')-дезоксиаденозина растворяли в 0,1 мл воды и прибавляли 12 мг (100 мкмоль) этилового эфира *D, L*-аланина в 0,1 мл *трет*-бутилового спирта и 10 мг (90 мкмоль) дициклогексилкарбодиимида в 0,1 мл *трет*-бутилового спирта. Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником. Кинетику реакции изучали с помощью БХ в системе А, как описано выше. Выход эфира (XI) после 3 ч реакции составлял 60%.

Препаративно соединение (XI) выделяли с помощью БХ в системе А. Зону с R_f 0,35 элюировали водой. Выход 60%.

Аналогично синтезировали этиловые эфиры (XII) и (XIII). После их гидролиза (1 н. HCl, 37°, 1 ч [14]) на хроматограммах в системе Б обнаружили d(pA-A-A), d(pT-T) и этиловый эфир аланина в соотношениях, близких 1 : 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тяглов Б. В., Громова Е. С., Зенин С. В., Сергеев Г. Б., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1975) Молекулярн. биология, 9, 652—666.
2. Громова Е. С., Долиная Н. Г., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1975) Биоорг. химия, 1, 1716—1727.
3. Недбай В. К., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1972) Докл. АН СССР, 205, 1114—1116.
4. Шабарова З. А., Сатарова Л. Г., Прокофьев М. А. (1958) Докл. АН СССР, 123, 864—866.
5. Воробьев О. Е., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1964) Докл. АН СССР, 158, 143—146.
6. Рябова Т. С., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1965) Биохимия, 30, 235—236.
7. Соколова Н. И., Носова В. А., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1972) Докл. АН СССР, 206, 129—131.
8. Юодка Б. А., Саснаускене С., Лиоранчайте Л. (1973) Ж. органич. химии, 9, 1630—1632.
9. Юодка Б. А. (1974) Ж. общ. химии, 44, 2592—2593.
10. Соколова Н. И., Гурова Г. И., Гатинская Л. Г., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1969) Молекулярн. биология, 3, 837—839.
11. Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1972) Ж. общ. химии, 42, 1630—1632.
12. Hoard D. E., Ott D. G. (1965) J. Amer. Chem. Soc., 87, 1785—1789.
13. Kozarich J. W., Chinault A. C., Hecht S. M. (1973) Biochemistry, 12, 4458—4460.
14. Юодка Б. А., Обручников И. В., Недбай В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1969) Биохимия, 34, 647—654.
15. Khorana H. G., Agarwal K. L., Bucki H., Caruthers M. H., Gupta N. K., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., RajBhandary U. L., Van de Sande J. H., Sgarbaccia V., Terao T., Weber H., Yamada T. (1972) J. Mol. Biol., 72, 209—492.

Поступила в редакцию
25.III.1976

OLIGONUCLEOTIDES AND NUCLEOTIDE-PEPTIDES. XXVI. THE SYNTHESIS OF NUCLEOTIDYL- AND OLIGONUCLEOTIDYL-(5' → N) AMINO-ACID (PEPTIDE) ESTERS

YUODKA B., LIORANCHAITTE L., YANUSHONITE L.,
SASNAUSKENE S.

State University, Vilnius

The methods for synthesis of nucleotidyl- and oligonucleotidyl-(5' → N) amino-acids and peptides are discussed. The optimal conditions were found for synthesizing nucleotidyl- and oligonucleotidyl-(5' → N) amino-acid esters, which involve dicyclohexylcarbodiimide in absolute or aqueous organic solvents. For the first time, carbonyl diimidazole has been applied to formation of nucleotide-peptides with phosphoamide bond between the fragments.