



УДК 547.963.32 : 543.544

**НОВЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ —
ПРОИЗВОДНЫЕ ФОСФОАМИДОВ УРИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ****Шибяев В. Н., Кусов Ю. Ю., Калинин Н. А.,
Кочетков Н. К.***Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Взаимодействием N^1 -(уридин-5'-фосфорил)- и N^1 -(уридин-5'-пирофосфорил)-1,6-диаминогексаянов с активированной бромцианом сефарозой получены биоспецифические сорбенты для ферментов, взаимодействующих с уридинсодержащими нуклеотидами. Сорбенты содержат иммобилизованные остатки UMP и UDP, связанные с матрицей фосфоамидной связью.

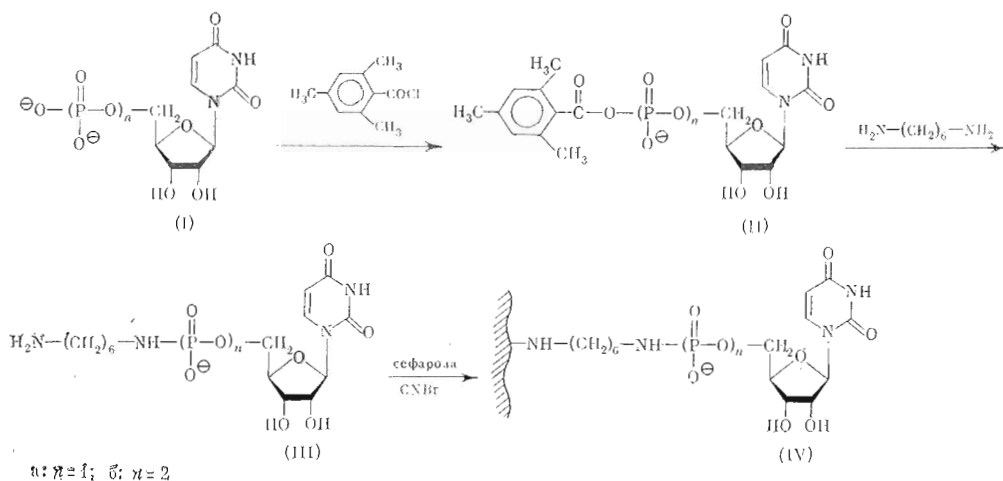
Аффинная хроматография с использованием адсорбентов, содержащих иммобилизованные нуклеотиды, получила в последние годы широкое распространение для очистки разнообразных ферментов [1, 2]. Особенно большое внимание уделялось получению адсорбентов — производных адениновых нуклеотидов, в то время как получение носителей с иммобилизованными уридиновыми нуклеотидами, которые, по-видимому, могут найти широкое применение при очистке большой группы ферментов, взаимодействующих с уридинсодержащими нуклеотидами, изучено в значительно меньшей степени. В описанных в литературе примерах иммобилизация производных UMP на агарозных матрицах осуществлялась через остаток рибозы после периодатного окисления цис-гликольной группировки [3—5] или через остаток фосфорной кислоты с помощью *n*-аминофениловых эфиров [6, 7], а иммобилизация UDP — через остаток рибозы [4] или β -фосфата с помощью δ -аминогексилового эфира [8].

Недавно предложен новый метод иммобилизации нуклеотидов на носителях, основанный на взаимодействии смешанных ангидридов нуклеотидов и мезитиленкарбоновой кислоты с NH_2 -группой аминогексилсефарозы [9, 10]. С помощью этого метода получены адсорбенты, связанные с различными моно- и олигонуклеотидами, а также нуклеотидполифосфатами, однако адсорбенты, содержащие производные уридиновых нуклеотидов, приготовлены не были.

Недостаток этого способа синтеза аффинных адсорбентов состоит в сохранении в полученной матрице незамещенных аминогрупп, что может приводить к появлению у сорбента ионообменных свойств и осложнениям при биоспецифической хроматографии [2]. Многообещающим кажется метод, основанный на взаимодействии лигандов, содержащих свободную аминогруппу, с активированной бромцианом сефарозой.

В настоящей работе мы сообщаем о получении на основе сефарозы адсорбентов, содержащих иммобилизованные остатки UMP и UDP, которые присоединены к матрице через остаток фосфата с помощью фос-

фоамидной связи [4]. Их получение из соответствующих нуклеотидов (I) включает в себя превращение последних в смешанные ангидриды (II) и затем в фосфоамиды — производные гексаметилендиамина (III), которые далее иммобилизуются на CNBr-сефарозе:



Конденсация UDP (Iб) с хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты (MesCOCl) проводилась в условиях, использованных ранее для синтеза смешанных ангидридов [11, 12]. Анализ реакционной смеси с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге показал присутствие двух главных нуклеотидных продуктов (IIа) и (IIб), образующихся в приблизительно равных количествах, неорганического фосфата и небольших количеств (Iа) и (Iб).

Этот результат указывает на значительное расщепление пирофосфатной связи нуклеотида в условиях реакции. В описанных ранее примерах получения смешанных ангидридов ADP и GDP такого расщепления пирофосфатной связи с образованием производных типа (IIа) не наблюдалось, хотя было отмечено появление неорганического фосфата (~15%) при взаимодействии MesCOCl с ATP [9].

Продукты реакции были разделены с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе; смешанные ангидриды (IIа) и (IIб) были выделены с выходами 39 и 37% соответственно (см. таблицу).

Идентичность УФ-спектров исходных и полученных соединений свидетельствует об отсутствии изменений гетероциклического основания. Величины отношения нуклеозид: фосфор показывают, что (IIа) является производным UMP, а (IIб) — производным UDP. При кислотном гидролизе (IIа) и (IIб) образуется мезитиленкарбоновая кислота и соответствующие нуклеотиды. В спектре ПМР имеются сигналы, характерные для остатка мезитиленкарбоновой кислоты и уридина. Совокупность всех этих фактов позволяет однозначно приписать соединениям (IIа) и (IIб) структуры смешанных ангидридов мезитиленкарбоновой кислоты с уридин-5'-моно- и дифосфатом соответственно.

Взаимодействие (Iа) с хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты гладко приводит к смешанному ангидриду (IIа), который после очистки ионообменной хроматографией получен с выходом 63%.

Для получения нуклеотидных лигандов со свободной аминогруппой смешанные ангидриды (IIа) и (IIб) вводили в реакцию с гексаметилендиаминном, используя 20–30-кратный избыток последнего для предотвращения возможного образования симметричных бис-фосфоамидных производных. Реакция заканчивалась за 5–7 ч при 20° и за 20 ч при 5°. Фосфоамид (IIIа), продукт конденсации смешанного ангидрида (IIа) с гексаме-

Соединение	R_f в системах		R_{UMP} в буфере В	Отношение уридин : об- щий фосфор : кисло- лабильный фосфор : : аминогруппа
	А	Б		
(IIa)	0,80	0,78	0,60	1,00 : 1,03 : 0,00—
(IIб)	0,68	0,64	0,85	1,00 : 2,15 : 0,99—
(IIIa)	0,47	0,28	0,35	1,00 : 1,06 : 0,00 : 1,09
(IIIб)	0,29	0,18	0,65	1,00 : 2,14 : 1,07 : 1,07

тилендиамином, выделен из реакционной смеси ионообменной хроматографией на даэксе 1×8 : попытка использования более слабого анионита — DEAE-целлюлозы — была неуспешной. После обессоливания гель-фильтрацией на сефадексе G-15 выход (IIIa) составил 63%.

Структура соединения (IIIa) определена отношением нуклеозид : фосфор : аминогруппа (см. таблицу), а также данными кислотного гидролиза, в результате которого из фосфоамида (IIIa) образуется гексаметилендиамин и UMP.

Для выделения фосфоамида (IIIб) из реакционной смеси в качестве ионообменника использована DEAE-целлюлоза; соединение (IIIб) получено в виде триэтиламмониевой соли с выходом 53%. Аналитические данные (см. таблицу), а также спектр ПМР подтверждают его структуру.

Фосфоамиды (IIIa) и (IIIб) могут быть получены, исходя из UDP, без промежуточного выделения смешанных ангидридов (IIa) и (IIб). В таком варианте фосфоамид (IIIб) выделен ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе с выходом 31%; по-видимому, фосфоамид (IIIa) может быть выделен из промывных вод ионообменной хроматографией на даэксе 1×8 . Полученный в одну стадию препарат (IIIб) содержал небольшое количество примеси, которая была отделена препаративным электрофорезом на бумаге.

Получение адсорбентов для аффинной хроматографии (IVa) и (IVб) осуществлено взаимодействием фосфоамидов (IIIa) и (IIIб) с активированной бромцианом сефарозой 4В. Для активации носителя применена модификация недавно описанной методики активации сефарозы в щелочном фосфатном буфере [13], состоящая в замене водного раствора бромциана раствором в ацетонитриле. Этот вариант активации геля оказался более эффективным, чем активация ацетонитрильным раствором бромциана в карбонатном буфере [14]*, и позволил получать воспроизводимые результаты.

Конденсация фосфоамидов (IIIa) и (IIIб) с активированной бромцианом сефарозой 4В проведена при pH 8,3. Остаточные активные центры сорбента удаляли обработкой этаноламином. В условиях реакции существенного гидролиза фосфоамидов не происходило, что позволяло их использовать для повторной конденсации. Были получены адсорбенты (IVa) и (IVб), содержащие 4,8 мкмоль фосфоамида (IIIa) и 5,2 мкмоль соединения (IIIб) на 1 мл геля соответственно.

Полученные адсорбенты оказались устойчивыми в условиях аффинной хроматографии при pH 8,1—8,5 и при хранении в нейтральных растворах при пониженной температуре; так, например, за 30—40 дней при 4° в растворе 1 М хлористого натрия степень десорбции УФ-поглощающего материала в случае адсорбента (IVa) составила менее 10%.

Степень иммобилизации полученного уридинфосфоамида сравнима с литературными данными по иммобилизации уридиновых нуклеотидов фосфоэфирной связью с помощью *n*-аминофениловых эфиров [6, 7] или в случае пиррофосфатов с помощью 6-аминогексилового эфира [8].

* При активации геля в карбонатном буфере добавлением раствора бромциана в ацетонитриле, как это описано в работе [14], степень иммобилизации фосфоамидов не превышала 0,5—0,8 мкмоль/мл геля.

Таким образом, описанный в настоящей работе метод получения сорбентов с иммобилизованными уридиновыми нуклеотидами, связанными фосфоамидной связью с матрицей, позволяет просто и с высокой эффективностью осуществить присоединение остатков нуклеотидов к матрице, не содержащей свободных аминогрупп. Полученные адсорбенты могут оказаться полезными при выделении и исследовании ферментов, проявляющих сродство к уридиновым нуклеотидам. Наши предварительные опыты свидетельствуют о высокой эффективности сорбента (IVa) при очистке фермента, катализирующего перенос остатка галактозилфосфата с уридинфосфатгалактозы на полипренолфосфат при биосинтезе O-специфического полисахарида сальмонелл. Примененный в данной работе подход, очевидно, может быть распространен и на другие нуклеотиды.

Экспериментальная часть

В работе использовали UMP и UDP (Reanal, ВНР), три-*n*-октиламин (Schuchardt, ФРГ), сефадекс G-15 и сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), DEAE-целлюлозу (Whatman, Англия).

Аналитическую хроматографию и электрофорез проводили на бумаге FN-11 (Filtrak, ГДР), а препаративную — на Whatman 3 MM (Англия). При БХ использовали системы: А — этанол — 1 М ацетат аммония, 5 : 2, рН 7,5; Б — изопропанол — аммиак — вода, 7 : 1 : 2; электрофорез проводили в 0,05 М триэтиламонийбикарбонатном буфере, рН 7,5 (буфер В) на приборе ПВЭФ-1 при градиенте напряжения 18 В/см.

Фосфорсодержащие и вещества с первичной аминогруппой обнаруживали на хроматограммах и электрофореграммах с помощью реагента Хайнса-Ишервуда и раствора нилгирина соответственно (прописи D45a и D112a в [15]). Количественное определение кислотлабильного и общего фосфора проводили по методам работ [16] и [17] соответственно, первичной аминогруппы — раствором тринитробензолсульфоната [18] с использованием для калибровки этаноламина.

Пиридин абсолютировали кипячением над P_2O_5 , ацетонитрил — над CaH_2 , бензол — над натрием и этанол — над магнием; все растворители перегоняли перед употреблением. Хлорангидрид мезитиленкарбоновой кислоты ($MesCOCl$) и бромциан получали по описанным методикам [19] и [20] соответственно.

Спектры ПМР снимали в D_2O на приборе WP-60 (Bruker, ФРГ) с накоплением в импульсном режиме (10 проходов) с подавлением сигнала растворителя (диоксан в качестве внутреннего стандарта); УФ-спектры снимали на спектрофотометре Unicam SP-8000 (Англия).

Конденсация хлорангидрида мезитиленкарбоновой кислоты с UDP. Водный раствор уридин-5'-дифосфата (0,3 ммоль) пропускали через колонку (1 × 5 см) с дауэксом 50 (H^+ -форма), нейтрализовали пиридином и упаривали до 1—2 мл. К остатку добавляли 0,45 ммоль три-*n*-октиламина в 1,5 мл пиридина, встряхивали до гомогенности, раствор упаривали и остаток тщательно высушивали многократной отгонкой со смесью абс. C_6H_6 — абс. $EtOH$ (1 : 1). Полученный остаток растворяли в 3 мл смеси абс. C_5H_5N — абс. CH_3CN (3 : 1), добавляли 3,74 ммоль (0,6 мл) $MesCOCl$, энергично встряхивали в течение 8 мин при 20°, добавляли 12 мл воды, $MesCOOH$ экстрагировали эфиром (6 × 5 мл); эфирный слой промывали водой (1 × 5 мл). Объединенный водный раствор разбавляли водой до 300 мл и наносили на колонку (3 × 24 см) с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- -форма); колонку промывали водой до отсутствия поглощения при 260 нм (390 мл) и элюировали линейным градиентом концентрации триэтиламонийбикарбоната (ТЕАБ) от 0 до 0,4 М (по 1 л). Фракции, содержащие УФ-поглощающий материал, объединяли и лиофилизовали с добавлением воды (5 × 10 мл) для удаления ТЕАБ. Выход триэтиламониевой соли (IIa) (элюируется 0,07 М ТЕАБ) составил 39% (117 мкмоль), а

триэтиламмониевой соли (IIб) (элюируется 0,14 М ТЕАБ) — 37% (111 мкмоль). Хроматографические и электрофоретические подвижности, а также аналитические данные приведены в таблице.

При гидролизе (0,1 н. HCl, 100°, 2 ч) ангидридов (IIа) и (IIб), по данным БХ и электрофореза, образуются MesCOOH, UMP, а также UDP в случае (IIб). Спектр ПМР аммониевой соли (IIб) (δ , м. д.): 7,69 д (6-Н $J_{5,6}$ 8 Гц); 6,74 с (протоны бензольного ядра); 5,84 м (5-Н + 1'-Н); 2,15 с и 2,08 с (3 СН₃).

Смешанный ангидрид мезитиленкарбоновой кислоты с UMP (IIа). Три-*n*-октиламмониевую соль UMP (0,6 ммоль), полученную по вышеописанной методике, тщательно высушивали, растворяли в 10 мл абс. пиридина и обрабатывали 7,84 ммоль (1,2 мл) MesCOCl в условиях, аналогичных получению (IIб). Выход ангидрида (IIа) составил 63% (378 мкмоль). Аналитические данные для соединения (IIа), а также его хроматографические и электрофоретические характеристики приведены в таблице.

N¹-(уридин-5'-фосфорил)-1,6-диаминогексан (IIIа). К раствору 0,19 ммоль (IIа) в 2 мл воды при 20° прибавляли по каплям в течение 10 мин 6 ммоль свежеперегнанного гексаметилендиамина в 1,5 мл воды. Через 20 ч при 4° реакцию смесь разбавляли до 1 л, наносили на колонку (3 × 25 см) с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻-форма) и промывали водой (200 мл). Элюировали линейным градиентом раствора ТЕАБ от 0 до 0,5 М по 1 л. Основное вещество (~74%) оказалось в промывных водах, в то время как в первой фракции — всего около 12% соединения (IIIа). Во второй фракции обнаружено около 8% исходного UMP. Промывные воды и первую фракцию объединяли и наносили на колонку (4,5 × 18 см) с дауэксом 1 × 8 (HCO₃⁻-форма) при 4–10°. Колонку промывали водой (500 мл) и элюировали вещества с колонки растворами ТЕАБ: 0,05 (200 мл), 0,075 (200 мл), 0,1 (500 мл), 0,125 (250 мл) и 1 М (110 мл). Основное количество вещества (93%) смывалось с колонки 0,1 М ТЕАБ, эту фракцию многократно лиофилизировали с добавлением воды для удаления ТЕАБ. Остаток растворяли в 2,5 мл воды и обессоливали на колонке (1,5 × 75 см) с сефадексом G-15; фракцию, содержащую (IIIа) (63%), лиофилизировали. Аналитический образец (IIIа) (см. таблицу) получали препаративным электрофорезом на бумаге Whatman 3 MM в буфере В. При кислотном гидролизе соединения (IIIа) (0,1 н. HCl, 100°, 2 ч), по данным БХ и электрофореза, наблюдалось образование гексаметилендиамина и UMP.

N¹-(уридин-5'-пирофосфорил)-1,6-диаминогексан (IIIб). А. К раствору 55 мкмоль (IIб) в 0,5 мл воды добавляли по каплям в течение 10 мин раствор 1 ммоль свежеперегнанного гексаметилендиамина в 0,5 мл воды. Через 20 ч при 20° реакцию смесь разбавляли водой до 500 мл и наносили на колонку (3 × 23 см) с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻-форма); колонку промывали водой (300 мл) и линейным градиентом ТЕАБ рН 7,5, от 0 до 0,36 М (по 1 л). Фракции, содержащие УФ-поглощающие вещества, объединяли и многократно лиофилизировали с добавлением воды. Выход (IIIб) составил 29 мкмоль (53%). Аналитический образец (см. таблицу) получен препаративной БХ в системе А. Спектр ПМР аммониевой соли (IIIб) (δ , м. д.): 7,89 д (6-Н, $J_{5,6}$ 8 Гц); 5,89 м (5-Н + 1'-Н); 2,87 т (СН₂ при С₆ гексаметилендиамина); 1,245; 1,146; 1,02 и 0,92 (5 СН₂, при С₍₁₎—С₍₅₎ гексаметилендиамина).

Б. 0,6 ммоль три-*n*-октиламмониевой соли UDP растворяли в смеси 9 мл абс. пиридина и 1,5 мл абс. ацетонитрила, добавляли 1,2 мл (7,84 ммоль) MesCOCl и энергично встряхивали 8 мин при 20°. Добавляли 12 мл воды, экстрагировали эфиром (5 × 10 мл). В водный слой, упаренный до 1 мл, добавляли в течение 20 мин 6 ммоль свежеперегнанного гексаметилендиамина в 1,2 мл воды. Через 20 ч при 3° реакцию смесь разбавляли водой до 1 л и наносили на колонку (2,5 × 30 см) с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻-форма); колонку промывали водой (500 мл) и линейным градиентом ТЕАБ от 0 до 0,4 М по 1 л. Фракции, содержащие УФ-по-

глошающие вещества, объединяли и многократно лиофилизировали с добавлением воды. Выход (IIIб) — 184 мкмоль (31%).

Активация сефарозы 4В бромцианом. К 1 мл сефарозы 4В добавляли 1 мл 5 М фосфатного буфера, pH 11,9, полученную суспензию охлаждали до 4° и добавляли при перемешивании раствор бромциана (100 мг) в ацетонитриле (0,1 мл). Через 10—15 мин перемешивания при 4° гель промывали на стеклянном фильтре 10 мл 0,25 М раствора NaHCO₃ и немедленно добавляли соответствующий лиганд.

Иммобилизация фосфоамида (IIIа) на сефарозе (IVа). К 1 мл свежерактивированной бромцианом сефарозы 4В в центрифужной пробирке добавляли 1 мл 0,25 М раствора NaHCO₃, pH 8,3, содержащего 103 мкмоль (IIIа), и оставляли при 4° на 20 ч при перемешивании. Смесь центрифугировали при 2000 об/мин, супернатант, содержащий 83 мкмоль (IIIа), лиофилизировали и использовали для повторной конденсации. К осадку геля добавляли 1 мл 0,25 М этаноламина и перемешивали 2 ч при 20°. Гель переносили в колонку и промывали последовательно 20 объемами 0,1 М CH₃COONa, 6 М мочевины, 0,1 М NaHCO₃ (все элюенты содержали 0,5 М NaCl) и, наконец, 1 М NaCl. Степень ковалентного присоединения фосфоамида (IIIа), определенная по УФ-поглощению и количеству общего фосфора, переходящего в раствор после гидролиза (0,6 н. HCl, 20°, 16 ч) аликвоты (0,1 мл) адсорбента (IVа), составила 4,8 мкмоль (IIIа) на 1 мл геля.

Иммобилизация фосфоамида (IIIб) на сефарозе (IVб). 1 мл свежерактивированной бромцианом сефарозы 4В обрабатывали 73,0 мкмоль фосфоамида (IIIб) по вышеописанной методике. Количество иммобилизованного лиганда, определенное по УФ-поглощению (5,2 мкмоль) и общему фосфору (10,3 мкмоль) в гидролизате адсорбента, составило 5,2 мкмоль (IIIб) на 1 мл сефарозы.

Авторы глубоко благодарны Н. И. Соколовой за ценные обсуждения и А. С. Шашкову за съемку спектров ПМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Спиридонова В. А. (1975) в сб. Итоги науки и техники. Молекулярная биология, т. 4 (под ред. Киселева Л. Л.), с. 176—217, ВИНТИ, М.
2. Lowe C. R., Dean D. G. (1974) Affinity Chromatography, London.
3. Robertson D. L., Davidson N. (1972) Biochemistry, 11, 533—537.
4. Lamed R., Levin Y., Wilchek M. (1973) Biochim. et biophys. acta, 304, 231—235.
5. Eichler D. C., Glitz D. G. (1974) Biochim. et biophys. acta, 335, 303—317.
6. Wilchek M., Gorecki M. (1969) Eur. J. Biochem., 11, 491—494.
7. Stewart G. R., Stevenson K. J. (1973) Biochem. J., 135, 427—441.
8. Barker R., Olsen K. W., Shaper J. H., Hill R. Z. (1972) J. Biol. Chem., 247, 7135—7147.
9. Носова В. В., Вельмога И. С., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) Докл. АН СССР, 219, 1134—1136.
10. Носова В. В., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1975) Биорган. химия, 1, 1130—1133.
11. Соколова Н. И., Носова В. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1972) Докл. АН СССР, 206, 129—132.
12. Moon M. W., Khorana H. G. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 1805—1809.
13. Sharma M., Slaunwhite W. B. (1975) Anal. Biochem., 68, 79—86.
14. March S. C., Parikh J., Cuatrecasas P. (1974) Anal. Biochem., 60, 149—152.
15. Хаїс И. М., Мацек К. (1962) Хроматография на бумаге, Изд-во иностр. лит., М.
16. Кочетков П. К., Будовский Э. И., Шибанов В. Н., Лебедева К. С. (1959) Изв. АН СССР. Сер. хлм., 897—903.
17. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin V. M. (1975) J. Chromatogr., 114, 129—141.
18. Satake K., Okuyama T., Ohashi M., Sinoda T. (1960) J. Biochem., 47, 654—660.
19. Барнес Г. (1952) Синтезы органических препаратов, сб. 3, с. 462—464, Изд-во иностр. лит., М.
20. Хартман В., Дрегер Б. (1949) Синтезы органических препаратов, сб. 2, с. 123, Изд-во иностр. лит., М.

Поступила в редакцию
1.VII.1975

NEW AFFINITY ADSORBENTS DERIVED FROM URIDINE
NUCLEOTIDE PHOSPHOAMIDATES

SHIBAEV V. N., KUSOV Yu. Yu., KALINCHUK N. A.,
KOCHETKOV N. K.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Biospecific adsorbents for uridine nucleotide-linked enzymes were prepared through reaction of N¹-(uridine-5'-phosphoryl)-or N¹-(uridine-5'-pyrophosphoryl)-4,6-diaminohexanes with BrCN-activated sepharose. The adsorbents contained immobilized uridine-5'-phosphate or-pyrophosphate residues linked to matrix through phosphoamide bond.
