



УДК 547.854 + 547.963 + 547.416

## КИНЕТИКА ИОНИЗАЦИИ С — СІ-СВЯЗИ В 4-(N-2-ХЛОРЭТИЛ-N-МЕТИЛАМИНО)БЕНЗИЛ-5'-ФОСФАМИДАХ НУКЛЕОЗИДОВ И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ \*

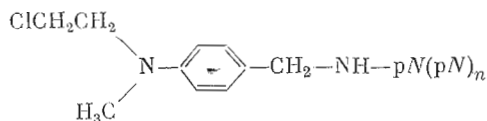
Гринева И. И., Ломакина Т. С., Тигеева И. Г.,  
Чумитова Т. А.

[Новосибирский институт органической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

Определены константы скорости лимитирующей стадии алкилирования — ионизации С—СІ-связи ( $k_0$ ) в  $\text{ClRCH}_2\text{NHpU}$ ,  $\text{ClRCH}_2\text{NHpd(TrT)}$  и  $\text{ClRCH}_2\text{NHpN(pN)}_5$  при разных температурах. Рассчитаны энергии активации ионизации и предэкспоненциальные множители. Величины  $k_0$  алкилирующих производных фосфамидов ди- — гексануклеотидов различного состава практически одинаковы. Отмечено уменьшение  $k_0$  в 2 раза при переходе от фосфамидов нуклеозидов к фосфамидам олигонуклеотидов.

Ранее было показано, что  $\text{ClRCH}_2\text{NHpU}$  и  $\text{ClRCH}_2\text{NHpN(pN)}_{3-5}$  алкилируют тРНК [1] и рРНК [2]. При этом производные олигонуклеотидов с  $n = 3$  и 5 аналогично  $(Np)_n\text{NCHRCI}$  [3] образуют с рРНК комплексы и эффективно алкилируют в рРНК участки связывания реагента [2].

Для исследования алкилирования нуклеиновых кислот реагентами типа



необходимы данные о константах скорости образования активных частиц — этилениммониевых катионов [4], возникающих в результате внутримолекулярного замещения у атома углерода С—СІ-связи. Ионизация этой связи является лимитирующей стадией в реакциях алкилирования хлорэтилалкилариламинами [5, 6]. В данной работе определены константы скоростей ионизации С—СІ-связи в  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_p\text{N(pN)}_5$  и  $\text{ClRCH}_2\text{NHpd(TrT)}$  при разных температурах в сравнении с  $k_0$  в  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  и хлорэтилметиламинобензилфосфамидах нуклеозидов. Ранее были определены  $k_0$  для  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_p\text{U}$  и  $\text{ClRCH}_2\text{NHpA}$  при 37° и pH 7 [1].

Необходимые для исследования алкилирующие производные получали при действии  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  на  $\text{P}^1$ ,  $\text{P}^2$ -дифенилуридин-5'-пирофосфат по методике работы [1] или на 5'-мезитиленкарбонилфосфат гексануклеоти-

\* Сокращения:  $(pN)_5$  — смесь гексануклеотидов, полученных при гидролизе тРНК неспецифичной 5'-эндонуклеазой;  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  — 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламин;  $\text{ClRCH}_2\text{NHpU}$ ,  $\text{ClRCH}_2\text{NHpd(TrT)}$ ,  $\text{ClRCH}_2\text{NHpN(pN)}_5$  — 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил-5'-фосфамиды уридина, d(pTrT) и  $(pN)_5$  соответственно;  $(Np)_{n-1}\text{NCHRCI}$  — 2', 3'-O[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]-олигонуклеотиды.

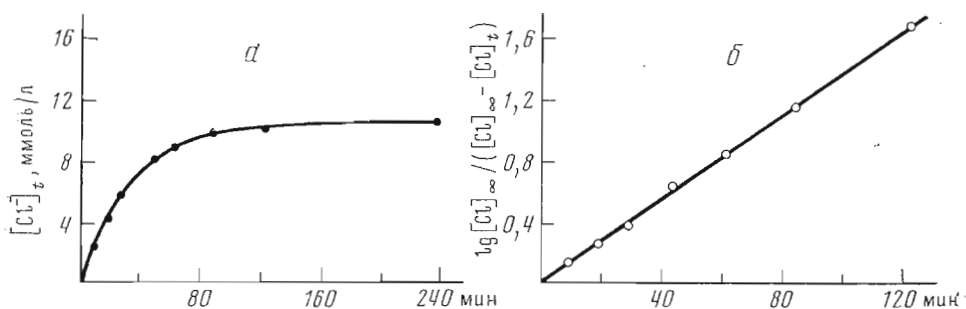


Рис. 1. Кинетическая кривая накопления ионов хлора при ионизации С—Сl-связи в  $\text{ClRCH}_2\text{NHpU}$  (а) и ее полулогарифмическая анаморфоза (б) ( $41^\circ$ ,  $0,05 \text{ M}$  Трис- $\text{HNO}_3$ -буфер,  $\text{pH}$  7,4):  $[\text{Cl}]_\infty$  — концентрация хлор-ионов при полной ионизации;  $[\text{Cl}]_t$  — текущая концентрация  $\text{Cl}^-$

да, аналогично методу получения бензилфосфамидов олигонуклеотидов [7]. Смесь гексануклеотидов  $(\text{pN})_6$  получена частичным гидролизом тРНК дрожжей неспецифичной 5'-эндонуклеазой *Serratia marcescens* в условиях, описанных для гидролиза РНК эндонуклеазой змеиног яда [8]. Фракция  $(\text{pN})_6$  выделена ионообменной хроматографией в 7 М мочеvine. Гексануклеотиды обработкой их триметилдетиламмониевых солей мезитиленкарбонилхлоридом превращали в мезитиленкарбонилфосфаты по описанному методу [7].

Доказательством строения полученных  $\text{ClRCH}_2\text{NHpN}(\text{pN})_5$  служили: 1) кислый гидролиз фосфамидов и определение соотношения  $(\text{pN})_6$ :  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  после разделения на дауэксе 1 в  $\text{Cl}^-$ -форме; 2) спектрофотометрическое определение содержания  $\text{ClRCH}_2\text{NHp}$ -группировки по УФ-поглощению при  $\text{pH}$  1 (ср. [9]); 3) потенциометрическое титрование хлор-иона в водных или щелочных гидролизатах фосфамидов; 4) отсутствие или небольшая примесь производных  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  нейтрального или катионного характера по данным хроматографии на DEAE-сефадексе при низкой ионной силе.

Для исследования кинетики ионизации С—Сl-связи использовали метод потенциометрического титрования ионов хлора. Ранее этим методом были определены  $k_0$  для различных  $(\text{Np})_{n-1}\text{NCHRCI}$  [5, 6]. Полученные данные приведены на рис. 1.

Зависимость логарифма концентрации от времени линейна, что указывает на первый порядок реакции. Из экспериментальных кинетических кривых рассчитаны константы скорости реакции первого порядка  $k_0$  при разных температурах (таблица).

Энергия активации и предэкспоненциальный множитель рассчитаны с помощью метода наименьших квадратов (рис. 2). Уравнение Аррениуса

Величины констант скорости ионизации ( $k_0$ ,  $\text{с}^{-1}$ ) С—Сl-связи

$^\circ\text{C}$	$\text{ClRCH}_2\text{NHpU}$	$\text{ClRCH}_2\text{NHpd}(\text{TpT})$	$\text{ClRCH}_2\text{NHpN}(\text{pN})_5$
20	$(3,15 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$(1,58 \pm 0,12) \cdot 10^{-5}$
25	$(1,38 \pm 0,04) \cdot 10^{-5}$		$(3,27 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$
30			$(0,73 \pm 0,11) \cdot 10^{-4}$
34			$1,02 \cdot 10^{-4} *$
37	$(3,0 \pm 0,15) \cdot 10^{-4}$		
40	$3,85 \cdot 10^{-4} *$	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-4} *$
48	$(11,5 \pm 0,14) \cdot 10^{-4}$		

\* Константы, рассчитанные из уравнения Аррениуса.

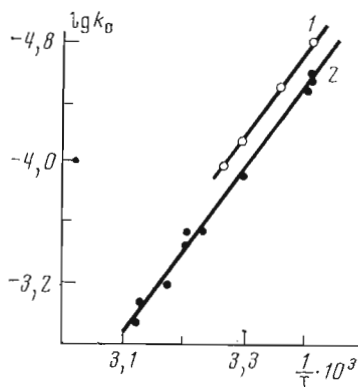


Рис. 2. Зависимость констант ионизации С—Сl-связи в  $\text{ClRCH}_2\text{NHpN}(\text{pN})_5$  (1) и  $\text{ClRCH}_2\text{NHpU}$  (2) от температуры

для ионизации С—Сl-связи записывается следующим образом:

$$k_0 = 1,47 \cdot 10^{13} \cdot e^{\frac{-23700}{RT}} \quad (\text{для } \text{ClRCH}_2\text{NHpU}),$$

$$k_0 = 2,18 \cdot 10^{13} \cdot e^{\frac{-24200}{RT}} \quad (\text{для } \text{ClRCH}_2\text{NHpN}(\text{pN})_5).$$

Сравнение полученных уравнений с уравнением Аррениуса для ионизации С—Сl-связи в метиловом эфире 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензилиден]-уридин-5'-фосфата [5] в водном растворе показывает, что значения предэкспоненциальных множителей совпадают по порядку величины и различия в константах ионизации связаны с величиной энергии активации.

Полученная нами константа ионизации С—Сl-связи в  $\text{ClRCH}_2\text{NHpU}$  в сопоставимых условиях ( $40^\circ$ , таблица) более чем в 3 раза превышает  $k_0$  для  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_3^+$ , определенную ранее  $((1,13 \pm 0,05) \cdot 10^{-4} \text{с}^{-1})$  [10]. Это связано, по всей вероятности, с большей электронной акцепторностью  $-\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ -группы в  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_3^+$  по сравнению с  $-\text{CH}_2\text{NH}-\text{PO}_3\text{N}$  в  $\text{ClRCH}_2\text{NHpU}$ . Значительное влияние характера заместителя в пара-положении на  $k_0$  в хлорэтилариламинах известно. Так, для 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензальдегида  $k_0$  в 30 раз ниже, чем  $k_0$  в его ацетатах [5, 6].

Величины констант ионизации С—Сl-связи в  $\text{ClRCH}_2-\text{NHpd}(\text{TpT})$  и  $\text{ClRCH}_2\text{NHpN}(\text{pN})_5$  практически не различаются (таблица). В то же время эти величины почти вдвое меньше  $k_0$  для  $\text{ClRCH}_2\text{NHpU}$ . Для  $\text{ClRCH}_2\text{NHpU}$  и  $\text{ClRCH}_2\text{NHpA}$   $k_0$  практически одинаковы (для последнего по [11]  $t_{1/2}$  40 мин при  $37^\circ$  и pH 6). Вероятно, для производных фосфамидов  $k_0$  не зависят от вида нуклеозида. В алкилирующих производных фосфамидов олигонуклеотидов последовательность, нуклеотидный состав и длина олигонуклеотида существенно не сказываются на константе скорости ионизации С—Сl-связи, во всяком случае в пределах гексануклеотидов. Аналогичная независимость  $k_0$  от характера и длины олигонуклеотидной части реагентов наблюдалась ранее для  $(\text{Np})_{n-1}\text{NCHRCI}$  [6]. Следовательно, полученные в данной работе значения  $k_0$ , энергии активации и предэкспоненциальных множителей для  $\text{ClRCH}_2\text{NHpN}(\text{pN})_5$  могут служить для выбора условий комплементарно адресованного алкилирования нуклеиновых кислот реагентами этого типа.

Уменьшение константы ионизации хлора в производных фосфамидов олигонуклеотидов, вероятно, связано с влиянием взаимодействия арильной группировки с системой соседних гетероциклических оснований олигонуклеотида, находящихся в стекинге, на основность ариламиногруппы, непосредственно определяющей скорость ионизации С—Сl-связи. Нековалентное взаимодействие арильной группы с соседним гетероциклическим основанием олигонуклеотидов, не нарушающее стекинга оснований в олигонуклеотидной части, было показано на примере 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил-5'-фосфамидов олигоаденилатов [12] и большого числа арилзамещенных 5'-фосфамидов олигонуклеотидов [13]. Если уменьшение  $k_0$  действительно связано с межплоскостным взаимодействием ароматических систем в  $\text{ClRCH}_2\text{NHpd}(\text{TpT})$  и  $\text{ClRCH}_2\text{NHpN}(\text{pN})_5$ , то оно указывает на электроакцепторные свойства оснований в стекинге и электронодонорные — диалкиламинобензиламиногруппы, что согласуется с представлениями о донорно-акцепторных свойствах гетероциклических оснований [14] и ароматических аминов [15].

## Экспериментальная часть

В работе использовали дрожжевую нефракционированную тРНК и 5'-эндонуклеазу *Serratia marcescens* (КФ 3.1.4.9) производства СКТБ БАВ, Новосибирск; DEAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция) и молселект-DEAE (Reanal, Венгрия).  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  и  $\text{ClRCH}_2\text{NHrpU}$  получали по методике работы [1],  $\text{ClRCH}_2\text{NHpd(TrT)}$  — по [9].

**Получение смеси гексануклеотидов ( $pN$ )<sub>6</sub>.** Гидролизовали 2 г тРНК в 120 мл 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,2, в присутствии 5000 единиц 5'-эндонуклеазы при 37° в токе азота до гидролиза 5% фосфодиэфирных связей, о чем судили по расходу 0,8 М щелочи. Фермент инактивировали нагреванием в течение 15 мин при 90°. Раствор обрабатывали 0,5 г бентонита, разбавляли до 0,02 М концентрации ионов и хроматографировали на DEAE-сефадексе (200 мл,  $\text{Cl}^-$ -форма) линейным градиентом 0,3 → 0,6 М  $\text{NaCl}$  в 7 М мочевины в 0,01 М Трис- $\text{HCl}$ -буфере, pH 7,6, при 60°. Фракции, содержащие ( $pN$ )<sub>6</sub>, рехроматографировали в тех же условиях. Щелочной гидролизат олигонуклеотида (0,6 н.  $\text{NaOH}$ , 22 ч при 40°) содержал  $N : Np : pNp$  в соотношении 1 : 4 : 1 (по данным хроматографии на DEAE-сефадексе).

**Получение  $\text{ClRCH}_2\text{NHrpN}(pN)_6$ .** 5'-Мезитиленкарбонилфосфат гексануклеотида получали по методике [7], выдерживали 3 мМ ( $pN$ )<sub>6</sub> в 36 мМ растворе мезитиленкарбонилхлорида в безводном пиридине 30 мин при 40°. После осаждения в эфир и промывания эфиром 540 мг смешанного ангидрида прибавляли к 8 мл 0,33 М  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  в диметилформамиде (конечная концентрация 7 мМ) и выдерживали 3 ч при 40°. Смесь выливали в 400 мл эфира, осадок растворяли в 10 мл диметилформамида, добавляли к нему 3,8 мл 1 М  $\text{NaI}$  в ацетоне. После осаждения и промывания ацетоном осадок нагревали с 2 мл абс. метанола до 40—50°, продукт отделяли и промывали вначале 2 мл, затем 1 мл метанола без нагревания. Выход  $\text{ClRCH}_2\text{NHrpN}(pN)_5$  105 мг (17%). Вещество не движется на бумаге в системе этанол —  $\text{NH}_3$  — вода, 80 : 2 : 18 ( $R_f$  0,05); других УФ-поглощающих веществ на хроматограмме не обнаружено. 0,232 мкмоль фосфамида наносили на колошку с DEAE-сефадексом (1 мл) и элюировали водой; на колонке адсорбировалось 90% вещества. 0,232 мкмоль фосфамида гидролизовали в 0,28 мл 0,1 н.  $\text{HCl}$  1 ч при 40°. Раствор нейтрализовали и после разбавления по 2 мл пропускали через колонку с дауэксом 1 ( $\text{Cl}^-$ -форма) объемом 1 мл. Вещество элюировали водой (8,26 мл); по  $\epsilon_{260}^{\text{pH}7}$   $14,7 \cdot 10^3$  [11] и УФ-поглощению при 260 нм в гидролизате найдено 80%  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$ . По разности УФ-поглощения в  $\text{ClRCH}_2\text{NHrpN}(pN)_5$  при pH 7 и 1 (260 нм) найдено 0,9 моль амина на 1 моль фосфамида (ср. [9]). Содержание ковалентного и ионного хлора 0,7 и 1,0 на 1 моль фосфамида, т. е. отношения ( $pN$ )<sub>6</sub> :  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  :  $\text{Cl} : \text{Cl}^-$  равно 1,0 : 0,7 : 0,7 : 1,0.

**Ионизация C—Cl-связи в реагентах.** После добавления 2 мл 25%  $\text{HNO}_3$  в метаноле к 6—10 мМ раствору исследуемого вещества (объем пробы 0,05—0,09 мл) ионный хлор определяли потенциометрическим титрованием 0,01 или 0,02 н. раствором  $\text{AgNO}_3$  на потенциометре ЛПУ-01 с хлор-серебряным электродом. В качестве электрода сравнения использовали каломельный электрод. Общий хлор определяли в пробе исследуемого вещества (0,3—0,9 мкмоль) после выдерживания 5—6 ч при 60° или гидролиза в 0,1 мл 0,84 н.  $\text{NaOH}$  в течение 1 ч при 100°, затем пробу подкисляли 2 мл 25%  $\text{HNO}_3$  в метаноле и титровали ионы хлора потенциометрически раствором  $\text{AgNO}_3$ . Ковалентный хлор вычисляли по разности общего и ионного хлора.

**Кинетика ионизации C—Cl-связи в  $\text{ClRCH}_2\text{NHrpU}$ .** 2 мл ~ 0,01 н. раствора  $\text{ClRCH}_2\text{NHrpU}$  в 0,05 н. Трис- $\text{HNO}_3$ -буфере, pH 7,5, термостатировали в интервале температур от 20 до 50°. При определенной температуре по ходу реакции отбирали пробы по 0,05—0,09 мл, реакцию останавливали подкислением 2 мл 25%  $\text{HNO}_3$  в метаноле. Концентрацию ионов хлора определяли потенциометрическим титрованием.

Аналогично изучали кинетику ионизации C—Cl-связи в  $\text{ClRCH}_2\text{NHpN}(\text{pN})_5$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богачев В. С., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1973) Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 4, 97—104.
2. Василенко С. К., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Козоровицкий А. Я., Ломакина Т. С., Саарма М. Ю., Трунов М. П. (1973) Докл. АН СССР, 212, 1227—1230.
3. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1974) Молекулярн. биология, 8, 832—844.
4. Benn M. H., Kazmaier P., Watanatada C. (1970) Chem. Commun., 1685—1686.
5. Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г. (1969) Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 1, 104—109.
6. Власов В. В., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1970) Молекулярн. биология, 4, 201—204.
7. Соколова Н. М., Носова В. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1972) Докл. АН СССР, 206, 129—131.
8. Vasilenko S. K., Ankilova V. N., Dimitrova F. F., Serbo N. A. (1972) FEBS Lett., 27, 215—218.
9. Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1972) Ж. общ. химии, 41, 1630—1634.
10. Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. (1971) Докл. АН СССР, 201, 609—611.
11. Богачев В. С., Венъяминова А. Г., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1970) Изв. СО АН СССР. Сер. хим., вып. 6, 110—116.
12. Grineva N. I., Kozorovitsky A. Ya., Lomakina T. S. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 46, 1603—1609.
13. Громова Е. С., Долинная Н. Г., Смирнова В. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1975) Биоорг. химия, 1, 1716—1727.
14. Pullman B., Pullman A. (1969) Progr. Nucleic Acid. Res. and Mol. Biol., 9, 327—402.
15. Гурьянова Е. Н., Гольдштейн И. П., Ромм И. П. (1973) Донорно-акцепторная связь, М., «Химия».

Поступила в редакцию  
29.VI.1976

#### KINETICS THE C—Cl BOND IONIZATION IN THE NUCLEOSIDE AND OLIGONUCLEOTIDE 4-(N-2-CHLOROETHYL-N-METHYLAMINO)BENZYL 5'-PHOSPHAMIDES

GRINEVA N. I., LOMAKINA T. S., TEGEYEVA N. G.,  
CHIMITOVA T. A.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of  
Academy of Sciences of USSR, Novosibirsk*

On studying the nucleic acids alkylation within complementary complexes with the alkylating derivatives of the oligonucleotide 5'-phosphamides, the rate constants of the rate-limiting step,  $k_0$ , have been determined at different temperature, namely  $k_0$  for the C—Cl bond ionization in the uridine, d(TpT) and a mixture of hexanucleotides 5'-(4-chloroethyl-N-methylamino)benzyl phosphamides. The activation energies and pre-exponential multiplier for the ionization step have been calculated.  $k_0$  of the alkylating phosphamides of di- to hexanucleotides that have various composition and nucleotide sequences are similar. It was found that for oligonucleotide derivatives  $k_0$  is two times lower than for nucleoside phosphamides.