



УДК 547.963.32.07

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

XXXI *. СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ВИРАЗОЛ

*Хабарова М. И., Клягина В. П., Соболева Н. А.,
Женодарова С. М.**Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино*

1- β -D-Рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (виразол, рибавирин) — противоопухолевый и противовирусный препарат — использован как акцептор фосфата в реакции образования межнуклеотидной связи, катализируемой рибонуклеазами. Субстратная специфичность малоспецифичной рибонуклеазы *Penicillium brevicompactum*, гуанилспецифичной рибонуклеазы *Aspergillus clavatus* и пиримидинспецифичной панкреатической рибонуклеазы допускает замену природного нуклеинового основания в акцепторе фосфата пятичленным циклом. Синтезированы динуклеозидмонофосфаты ArV, GrV, CpV и UpV с выходами 15–25%. На примере синтеза тринуклеозиддифосфатов ArVpU и GrVpU показано, что динуклеозидмонофосфаты, имеющие виразол на 3'-конце, могут служить праймерами при ограниченном присоединении нуклеотидных остатков в присутствии полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus*.

Среди антиметаболитов нуклеозидной природы большое внимание исследователей в последние годы привлекает 1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (виразол, рибавирин) — противоопухолевый и противовирусный препарат [2, 3], подавляющий репродукцию ряда ДНК- и РНК-содержащих вирусов, в том числе вирусов гриппа А и В [4]. Для изучения механизма действия этого препарата необходимы олигорибонуклеотиды, содержащие виразол. Их можно было бы использовать наряду с олигонуклеотидами, имитирующими начало РНК-продукта и служащими затравками при изучении инициации синтеза РНК [5]. В связи с этим в настоящей работе мы исследовали возможность ферментативного синтеза олигорибонуклеотидов, в состав которых входит виразол.

Ранее было показано, что различные рибонуклеазы являются эффективными катализаторами синтеза олигорибонуклеотидов, содержащих нуклеотидные остатки, модифицированные как в углеводной, так и в гетероциклической частях молекулы [6]. Однако для подобных синтезов до настоящего времени модификации в гетероцикле заключались во введении различных заместителей в пиримидиновое или пуриновое ядро. Поэтому первый этап настоящей работы состоял в изучении виразола как субстрата рибонуклеаз в реакции образования межнуклеотидной связи. Мы использовали виразол в качестве акцептора фосфата при получении динуклеозидмонофосфатов в присутствии малоспецифичной рибонуклеазы *Penicillium brevicompactum*, гуанилспецифичной рибонуклеазы *Aspergillus*

* Сообщение XXX см. [1]. Сокращения: V — 1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид, виразол; E-СМ-целлюлоза — рибонуклеаза *P. brevicompactum*, ковалентно связанная с СМ-целлюлозой; остальные сокращения соответствуют общепринятым.

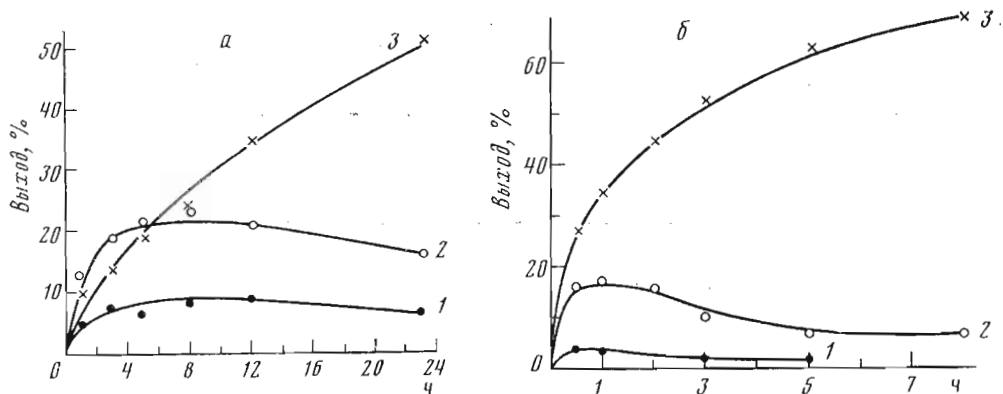


Рис. 1. Зависимость выхода продуктов реакции от времени при инкубировании смеси G>p и V с рибонуклеазой *P. brevicompactum* при pH 7,0 (а) и 4,6 (б): 1 — GrG>p, 2 — GrV, 3 — Gr

clavatus и пиримидинспецифичной панкреатической рибонуклеазы. Донорами фосфата служили пуриновые и пиримидиновые нуклеозид-2',3'-циклофосфаты. Синтез проводили в условиях, обычно применяемых для получения динуклеозидмонофосфатов с помощью этих ферментов [6] (табл. 1).

Субстратная специфичность примененных нами ферментов допускает замену природного нуклеинового основания в акцепторе фосфата пятичленным циклом — 1,2,4-триазол-3-карбоксамидом. Во всех случаях мы наблюдали образование соответствующих динуклеозидмонофосфатов с довольно высоким выходом. Следует отметить, что для всех ферментов, за исключением гуанилрибонуклеазы *A. clavatus*, возрастает скорость синтеза по сравнению с синтезом из обычных субстратов. Наибольшее увеличение скорости реакции наблюдается при проведении синтезов с участием малоспецифичной рибонуклеазы *P. brevicompactum*: если максимальное количество ApC и ApU образуется через 72 и 48 ч соответственно, то выход ApV достигает максимальной величины уже через 30 мин. В присутствии виразола ускоряются и другие реакции, катализируемые рибонуклеазой и протекающие одновременно с синтезом динуклеозидмонофосфата: самоконденсация донора фосфата, приводящая к образованию соответствующего 2',3'-циклофосфата динуклеотида (NpN>p), а также гидролиз нуклеозид-2',3'-циклофосфата (ко времени установления равновесного состояния реакция смесь содержит от 45 до 65% исходного нуклеозид-2',3'-циклофосфата).

Величина pH-оптимума получения ApC и GrC с помощью *Pen. brevicompactum* составляет 7,0 и 4,6 соответственно [7], поэтому мы провели синтез GrV при указанных значениях pH. Скорость образования GrV выше при pH 4,6 (рис. 1), однако больший выход динуклеозидмонофосфата достигается при pH 7,0. В кислом буфере легко образуется гель, а при pH 7,0 реакционная смесь остается в виде раствора. В связи с этим препаративный синтез GrV рациональнее проводить в нейтральном буферном растворе.

При использовании рибонуклеазы *P. brevicompactum*, ковалентно связанной с СМ-целлюлозой, скорость синтеза и выходы ApV и GrV уменьшаются по сравнению с исходным ферментом, хотя и в этом случае динуклеозидмонофосфаты образуются быстрее, чем с природными субстратами.

Разделение реакционных смесей проводили с помощью препаративного электрофореза на бумаге и последующей очистки динуклеозидмонофосфатов хроматографией на бумаге. Гомогенность выделенных таким образом динуклеозидмонофосфатов подтверждалась микрохроматографией

Таблица 1

Синтез динуклеозидмонофосфатов NpV, содержащих виразол, в присутствии различных рибонуклеаз

N	Рибонуклеаза 1*	Время, ч	Выход на исходный N > p, %
A	<i>P. brevicompactum</i> (0,45)	0,5	25
A	<i>E</i> -СМ-целлюлоза (0,25)	10	14
G	<i>P. brevicompactum</i> (0,45)	8	23
G	<i>P. brevicompactum</i> 2* (0,45)	1	16
G	<i>E</i> -СМ-целлюлоза (0,25)	24	14
G	<i>A. clavatus</i> (6)	55	22
U	Панкреатическая 3* (0,22)	12	16
C	Панкреатическая 3* (0,22)	12	16

1* В скобках приведена концентрация фермента в ед. акт./мл (см. «Эксперимент. часть»).

2* Синтез проводили при pH 4,6.

3* Концентрация фермента указана в мг/мл.

Таблица 2

Характеристики олигорибонуклеотидов, содержащих виразол

Олигонуклеотид	* R_f (система)	U^* отн	Ферментативный гидролиз		УФ-спектр в воде
			Фермент	Продукты, поглощающие в УФ (отношение)	$\lambda_{\text{макс}}$
ApV	1,22(A)	0,48	Рибонуклеаза <i>P. brev.</i> Рибонуклеаза T ₂ Фосфодиэстераза змеиного яда Фосфодиэстераза селезенки	Ap Ap A Ap	260
ApVpU	0,92(B)	0,72 **	Рибонуклеаза <i>P. brev.</i> Фосфодиэстераза змеиного яда	Ap; U (0,9 : 1) A; pU (1 : 1)	262
ApVpUpU	0,60(B)	0,76 **	То же	A; pU (1 : 2)	258
GpV	1,30(A)	0,60	»	G	253
GpVpU	0,74(B) **	0,75 **	Рибонуклеаза T ₁	Gp, U (1 : 1)	258
GpVpUpU	0,46(B) **	0,84 **	»	Gp; UpU (1 : 1)	258
UpV	1,30(A)	0,74	Рибонуклеаза <i>P. brev.</i> Фосфодиэстераза змеиного яда	Up U	263
CpV	1,34(A)	0,63	Рибонуклеаза <i>P. brev.</i> Фосфодиэстераза змеиного яда	Cp C	273
V	1,80(A)	0,27			

* Определены относительно 5'-концевого нуклеотида.

** Определены относительно Up.

на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины (рис. 2).

Структуру динуклеозидмонофосфатов подтверждали ферментативным гидролизом и анализом гидролизата с помощью хроматографии на бумаге и УФ-спектрофотометрии. Так как виразол не поглощает в области спектра, соответствующей нуклеозидам (230–280 нм), и в составе гидролизата динуклеозидмонофосфата, содержащего виразол, вышеуказанным способом может быть обнаружен только один компонент, мы расщепляли

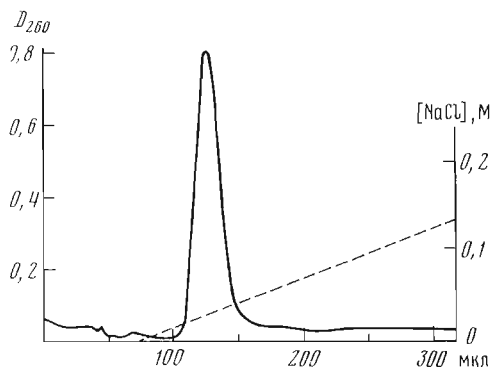


Рис. 2. Микроколоночная хроматография ApV на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine; колонка 0,8×60 мм; скорость элюции 300 мкл/ч; запись на МСФП-I

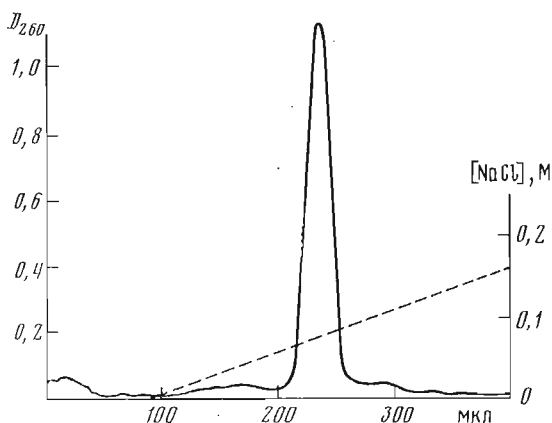
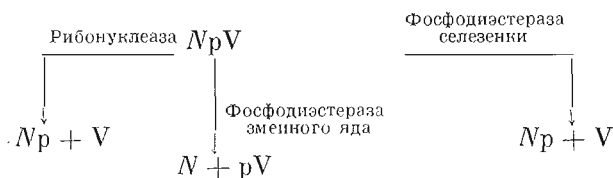


Рис. 3. Микроколоночная хроматография GpVpU на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine; колонка 0,8×60 мм; скорость элюции 300 мкл/ч; запись на МСФП-I

динуклеозидмонофосфаты типа NpV ферментами трех различных групп: малоспецифичной рибонуклеазой (*P. brevicompactum* и T_2), фосфодиэстеразой змеиного яда и фосфодиэстеразой селезенки. В соответствии со способом действия этих ферментов (см. схему) в гидролизатах были найдены нуклеозид-3'-фосфат (рибонуклеаза и фосфодиэстераза селезенки) и нуклеозид (фосфодиэстераза змеиного яда), что подтверждает наличие в обрабатываемых ферментами соединениях фосфодиэфирной связи.



Характеристики синтезированных динуклеозидмонофосфатов приведены в табл. 2.

Виразол, не вступивший в реакцию, был регенерирован следующим образом: соответствующие участки электрофореграмм экстрагировали 70% этанолом, экстракт упаривали досуха в вакууме, остаток растворяли в небольшом объеме воды, наносили на колонку с сефадексом G-10 и элюировали водой, определяя содержание виразола в элюате спектрофотометри-

Синтез тринуклеозиддифосфатов с участием полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus*

Акцептор фосфата	Тринуклеозиддифосфат	Выход на исходный NpV , %		Регенерировано NpV , %
		$NpVpU$	$NpVpUpU$	
ApV	ApVpU	7	3	60
GpV	GpVpU	4	2	54

чески ($\lambda_{\text{макс}}$ 210 нм). Фракции, содержащие виразол, лиофильно высушивали. Температура плавления полученного вещества 166°С, что соответствует литературным данным для 1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамида [8] и подтверждает устойчивость последнего в условиях проведения синтеза динуклеозидмонофосфатов и разделения реакционной смеси.

Динуклеозидмонофосфаты ApV и GpV были использованы в качестве праймеров в реакции ограниченного присоединения нуклеотидных остатков, катализируемой полинуклеотидфосфорилазой. В условиях, наиболее благоприятных для получения тринуклеозиддифосфатов [9], мы инкубировали смесь ApV или GpV и 5'-дифосфата уридина с полинуклеотидфосфорилазой *Micrococcus luteus*. В обоих случаях (см. табл. 3) образуется тринуклеозиддифосфат ApVpU или GpVpU соответственно, тетра- и пентануклеозидтрифосфат ApVpUpU или GpVpUpU и незначительное количество более длинных олигонуклеотидов. Замена 3'-концевого нуклеозида праймера виразолом приводит к уменьшению выхода тринуклеозиддифосфата (ср. [9]).

Выделение тринуклеозиддифосфатов ApVpU и GpVpU и тетра- и пентануклеозидтрифосфатов ApVpUpU и GpVpUpU проводили с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге [9], гомогенность полученных олигонуклеотидов подтверждали микрохроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine (рис. 3), а их структуру — ферментативным гидролизом и анализом гидролизата с помощью хроматографии на бумаге и УФ-спектрофотометрии (см. табл. 2).

Экспериментальная часть

В работе использовали натриевые соли 2',3'-циклофосфатов аденозина, уридина и цитидина и 5'-дифосфата уридина, панкреатическую рибонуклеазу (КФ 2.7.7.16, Reanal, Венгрия), циклогексилгуанидиниевую соль 2',3'-циклофосфата гуанозина, полинуклеотидфосфорилазу *M. luteus* (КФ 2.7.7.8) и рибонуклеазу T₂ (КФ 2.7.7.17, Calbiochem, США), 1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (ICN Pharmacia, США), фосфодиэстеразы змеиного яда *Crotalus adamantus* (КФ 3.1.4.1) и селезенки (КФ 3.1.4.1, Koch Light, Англия). Циклогексилгуанидиниевую соль G>p превращали в аммониевую соль обработкой дауэксом 50W (NH₄⁺-форма). Для препаративных целей применяли виразол, синтезированный в Институте органического синтеза Академии наук ЛатвССР.

Малоспецифичная рибонуклеаза *P. brevicompactum* (КФ 3.1.4.23) и гуанилрибонуклеаза *A. clavatus* (КФ 3.1.4.8) выделены С. И. Безбородовой и сотр. (ИБФМ АН СССР) [10—11]. E-СМ-целлюлоза приготовлена нами как описано в работе [12]. За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющее при 37°С 1 мкмоль: С>p за 1 мин при рН 5,2 (рибонуклеаза *P. brevicompactum*); G>p за 30 мин при рН 7,8 (рибонуклеаза *A. clavatus*) или A>p за 1 мин при рН 7,0 (E-СМ-целлюлоза).

Хроматографию и электрофорез проводили на бумаге FN-3 (Filtrak, ГДР). Для нисходящей хроматографии использовали следующие системы растворителей: А — этанол — пропанол-2 — конц. аммиак — вода (60 : 5 : 10 : 25); Б — этанол — 1 М ацетат аммония (7 : 3). Вертикальный электрофорез проводили в течение 2 ч при напряжении 20 В/см в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламмония, рН 8,0.

Синтез динуклеозидмонофосфатов, катализируемый рибонуклеазами. Раствор $N \gg p$ (0,1 М) и виразола (0,3 М) в 0,2 М фосфатном буфере, рН 7,0 (рибонуклеаза *P. brevicompactum*, E-СМ-целлюлоза), 0,2 М ацетатном буфере, рН 4,6 (рибонуклеаза *P. brevicompactum*), 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,8 (рибонуклеаза *A. clavatus*) или 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 7,6 (панкреатическая рибонуклеаза), инкубировали с ферментами при $\sim 0^\circ\text{C}$. Продолжительность инкубирования и концентрация ферментов приведены в табл. 1. По истечении указанного времени (соответствует максимальному выходу и установлено по результатам изучения зависимости выхода динуклеозидмонофосфата от времени) реакционную смесь наносили на бумагу и разделяли, комбинируя электрофорез и хроматографию на бумаге в системе А.

Синтез тринуклеозиддифосфатов с полинуклеотидфосфорилазой M. luteus. Раствор $N \gg p$ (0,01 М) и уридин-5'-дифосфата (0,005 М) инкубировали с ферментом (6 мг/мл) в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 9,0, содержащем 0,01 М MgCl_2 и 0,05 мМ EDTA, в течение 2 ч при 37°C . Реакционную смесь делили с помощью препаративной хроматографии на бумаге в системе А (17–20 ч). Олигонуклеотиды дополнительно освобождали от примесей электрофорезом на бумаге и повторной хроматографией в системе Б.

ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Антонович Е. Г. Ступенчатый синтез олигонуклеотидов. XXX. Синтез 5'-фосфорилированных олигорибонуклеотидов.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1516–1521.
2. Sidwell R. W., Robins R. K., Hillyard I. W. Ribavirin: an antiviral agent.— Pharmac. Ther., 1979, v. 6, p. 123–146.
3. Лесная Н. А., Платонова Г. Н., Переголчина Н. М., Софьина З. П., Сметанкина О. З. Противопопулярная активность антивирусного препарата виразола.— Тез. докл. I Всес. конф. по химии нуклеозидов и нуклеотидов. Рига: Зинатне, 1978, с. 143–144.
4. Линицкая Г. Л., Яцина А. А., Галегов Г. А. О механизме действия 1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамиды (виразола, рибовиррина) на репродукцию вируса гриппа.— Тез. докл. I Всес. конф. по химии нуклеозидов и нуклеотидов. Рига: Зинатне, 1978, с. 145–147.
5. Хесин Р. Б. Инициация синтеза РНК.— Молекулярн. биология, 1977, т. 11, № 6, с. 1344–1356.
6. Женодарова С. М. Ферментативный синтез олигорибонуклеотидов. Автореф. дис. на соискание уч. ст. д-ра хим. наук. М.: МГУ, 1978. 48 с.
7. Хабарова М. И., Женодарова С. М. Ступенчатый синтез олигонуклеотидов. Синтез динуклеозидмонофосфатов, катализируемый рибонуклеазой *Penicillium brevicompactum*.— Молекулярн. биология, 1972, т. 6, № 5, с. 682–688.
8. Witkowski J. T., Robins R. K., Sidwell R. W., Simon L. N. Design. Synthesis and broad spectrum antiviral activity of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides.— J. Med. Chem., 1972, v. 15, № 11, p. 1150–1154.
9. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А. Ступенчатый синтез олигонуклеотидов. XXIХ. Полинуклеотидфосфорилаза в синтезе олигорибонуклеотидов.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1505–1515.
10. Безбородова С. И., Ильина Т. В., Захарова Н. Г., Крупяно В. И. Исследование внеклеточной рибонуклеазы *Pen. brevicompactum*.— Биохимия, 1971, т. 36, № 3, с. 474–482.
11. Безбородова С. И., Гуляева В. И., Морозова В. Г. Специфичность расщепления и синтеза динуклеозидмонофосфатов рибонуклеазой *S. Asp. clavatus*.— Прикл. биохим. и микробиол., 1975, т. 11, № 1, с. 9–13.
12. Женодарова С. М., Соболева И. А., Хабарова М. И., Ежов В. А., Приходько А. Г. Ступенчатый синтез олигонуклеотидов. XXVIII. Имобилизованная рибонуклеаза *Pen. brevicompactum* в синтезе олигорибонуклеотидов.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 736–742.

Поступила в редакцию
3.IV.1981

STEPWISE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS. XXXI. SYNTHESIS
OF VIRAZOLE-CONTAINING OLIGORIBONUCLEOTIDES

KHABAROVA M. I., KLYAGINA V. P., SOBOLEVA I. A.,
ZHENODAROVA S. M.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

Antiviral agent 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ribavirin) has been used as an acceptor in the synthesis of internucleotide bond catalyzed by different ribonucleases. The substrate specificity of nonspecific ribonuclease *Pen. brevicompactum*, guanylspecific ribonuclease *Asp. clavatus* and pancreatic ribonuclease permits the substitution of the native nucleic base in the phosphate acceptor for a 5-membered ring. The dinucleoside monophosphates ApV, GpV, CpV and UpV were synthesized, with the yield of 15–25%. Dinucleoside monophosphates having virazole at the 3'-end were used as primers in the synthesis of trinucleoside diphosphates ApVpU and GpVpU with polynucleotide phosphorylase *M. luteus*.
