



УДК 577.113.4

ПОЛУЧЕНИЕ ФОСФАМИДОВ МОНО- И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ  
В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Шабарова З. А.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Разработан эффективный метод получения фосфамидов моно- и олигонуклеотидов в водной среде, заключающийся в конденсации нуклеотидного компонента с любым первичным или вторичным амином в присутствии 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид. Конденсация проводится при рН, на единицу меньшем  $pK_a$  амина. Время конденсации составляет 0,5–4 ч для аминов с  $pK_a < 8$  и 4–20 ч для аминов с  $pK_a > 8$ . Выходы фосфамидов моно- и олигонуклеотидов составляют 85–100%. Метод применим для получения 3'- и 5'-фосфамидов моно- и олигонуклеотидов дезоксириборяда и 5'-фосфамидов моно- и олигонуклеотидов риборяда.

Фосфамиды моно- и олигонуклеотидов широко используются в качестве реагентов для аффинной модификации белков и нуклеиновых кислот [1], исходных соединений при получении ди- и трифосфатов моно- и олигонуклеотидов [2], а также для химической «сборки» полинуклеотидов в матрично-направленных реакциях [3]. Фосфамиды, содержащие остаток аминокислоты или пептида, используются в качестве моделей природных нуклеопротеинов [4].

Для получения амидов моно- и олигонуклеотидов разработан ряд методов: пирофосфатный [5], метод с использованием дициклогексилкарбодимидов [6], метод смешанных ангидридов с мезитиленкарбоновой кислотой [7], метод окислительно-восстановительной конденсации [8]. Все они основаны на активации фосфатных групп моно- или олигонуклеотидов в безводной среде или среде, содержащей не более 15% воды, и требуют, следовательно, перевода нуклеотидного материала в форму, растворимую в органических растворителях. Это общий недостаток указанных методов, поскольку перевод достаточно протяженных (более 8–10-звенных) олигонуклеотидов, фрагментов ДНК и РНК в форму, растворимую в органических растворителях, — трудоемкая и низкоэффективная операция. Кроме того, каждый из этих методов имеет ограничения как в отношении природы используемого аминокомпонента, так и в отношении вводимого в реакцию олигонуклеотида. Так, метод смешанных ангидридов с мезитиленкарбоновой кислотой оказался низкоэффективным для получения производных слабоосновных аминов с  $pK_a < 5$ , метод окислительно-восстановительной конденсации эффективен только для аминов средней основности с  $pK_a$  6–11, метод с использованием дициклогексилкарбодимидов не дает возможности получать производные сильноосновных аминов с  $pK_a > 9$ . С другой стороны, ни один из описанных методов, за исключением метода окислительно-восстановительной конденсации, не позволяет получать производные олигонуклеотидов риборяда, а метод окислительно-восстановительной конденсации не пригоден для получения производных по 3'-концевой фосфатной группе.

В настоящей работе предлагается общий и эффективный метод получения фосфамидов моно- и олигонуклеотидов в водной среде. Метод заключается в конденсации нуклеотидного и аминного компонентов в присутствии водорастворимого 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид.

Эффективность конденсации рДТ с аминами под действием EDC  
при различных значениях рН

Концентрация рДТ  $2 \cdot 10^{-2}$  М, амина — 3 М, EDC — 0,5 М

Амины	рН	Выход фосфамида, %	Амины	рН	Выход фосфамида, %	Амины	рН	Выход фосфамида, %
Имидазол *	5,0	0	Морфолин **	6,3	0	н-Бутиламин ***	8,5	0
	5,7	75		6,9	70		9,2	55
	6,0	100		7,3	100		9,8	80
	6,3	60		7,6	65		10,4	20
	7,0	15		8,3	10		11,0	0

\*  $pK_a$  7,0 [10], \*\*  $pK_a$  8,3 [11], \*\*\*  $pK_a$  10,8 [11].

Таблица 2

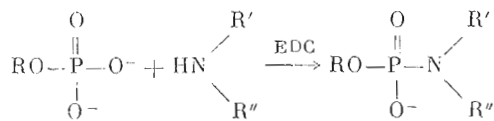
Получение амидов моно- и олигонуклеотидов с помощью EDC в воде

Концентрация амина 3М, EDC — 0,5 М

Моно- или олигонуклеотид	Амин *	рН	Концентрация нуклеотида, мМ	Время процесса	Выход фосфамида, %
рДТ	Анилин	3,5	20	5 мин	100
	»	4,5		2 ч	100
	Имидазол	6,0		15 мин	100
	Морфолин	7,3		2 ч	100
	Метилловый эфир глицина	6,7		2 ч	90
	Бензиламин	8,3		5 ч	90
d(TTGAATGp)	н-Бутиламин	9,8	0,2	20 ч	80
	Анилин	4,5		3 ч	90
	Имидазол	6,0		1 ч	95
	Морфолин	7,3		4 ч	85
	Метилловый эфир глицина	6,7		4 ч	85
	(pA) <sub>7</sub>	Анилин		4,5	0,2
Имидазол		6,0	1 ч	85	

\* Для анилина, метилового эфира глицина и бензиламина  $pK_a$  составляют 4,6 [11], 7,7 [12] и 9,3 [11] соответственно; величины  $pK_a$  прочих аминов см. в табл. 1.

да при строго определенном значении рН:



(R — остаток моно- или олигонуклеотида,  $\begin{array}{l} \text{R}' \\ \text{HN} \\ \text{R}'' \end{array}$  — любой первичный или вторичный амин).

Мы установили, что существует сильная зависимость эффективности конденсации от рН реакционной среды, индивидуальная для каждого амина (табл. 1). Анализируя приведенные данные, можно заключить, что максимальная эффективность конденсации наблюдается при значении рН, на единицу меньшем  $pK_a$  амина. Очевидно, что при таком значении рН соотношение протонированной и непротонированной форм амина является оптимальным для протекания карбодимидной конденсации, в которой, как известно [9], участвуют обе формы амина. Следует подчеркнуть, что конденсация эффективна лишь при достаточно высокой концентрации

амина. Конкретные условия синтеза различных фосфамидов представлены в табл. 2.

Следует отметить что время конденсации также различно для аминов разной основности. Так, для аминов с  $pK_a$  5—9 время реакции составляет 0,25—4 ч (табл. 2). Для слабоосновных аминов с  $pK_a < 5$  время конденсации сокращается до 3—5 мин. При увеличении продолжительности реакции выход фосфамида из-за одновременно протекающего гидролиза снижается. Поэтому в случае слабоосновных аминов иногда удобнее работать не в оптимальных условиях, а при 4,5—5,0, увеличивая при этом время конденсации (табл. 2). При этих значениях pH образующиеся фосфамиды практически не гидролизуются и, кроме того, снижается вероятность апуринизации олигонуклеотидов. При работе с сильноосновными аминами с  $pK_a > 9$  время конденсации увеличивается до 20 ч. При этом необходимо учитывать протекание побочной реакции модификации гетероциклических оснований под действием карбодимида [13]. Известно, что скорость модификации максимальна для урацила и тимина [13]. В найденных нами условиях конденсации под действием 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимида степень модификации тимина составляет 30% при pH 8 и 20% при pH 9 за 2 ч или соответственно 70 и 50% за 20 ч. Мы нашли условия, позволяющие количественно разрушать образующиеся аддукты гетероциклических оснований с карбодимидом. При обработке фосфамидов, содержащих модифицированные гетероциклические основания 25% водным раствором аммиака (12 ч, 20° С), происходит полная регенерация немодифицированных фосфамидов. Эту обработку можно проводить сразу по окончании конденсации, добавляя к реакционной смеси концентрированный водный раствор аммиака.

Фосфамиды рdГ были выделены методом электрофореза на бумаге в 0,05 М ТЕАВ при pH 8,0—8,5. Полученные анид, имидазолид, морфолид, бензиламид и бутиламид дезокситимидиловой кислоты идентифицированы по данным хроматографии на бумаге и электрофореза с соединениями, полученными в нашей лаборатории ранее [7]. Структуру фосфамида ( $C_8H_{13}N_3O_3$ ) рdГ доказывали следующим образом: сначала проводили количественное омыление метилового эфира смесью вода — триэтиламин — пиридин, 5:3:2 (по объему), при 20° С в течение 20 ч, затем гидролиз фосфамидной связи 0,1 н. HCl при 37° С в течение 1 сут. Количество рdГ в гидролизате определяли спектрофотометрически, количество глицина — на аминокислотном анализаторе. Соотношение нуклеотид — глицин 1:0,9.

Фосфамиды олигонуклеотидов отделяли от избытка реагентов гель-фильтрацией на биогеле Р-2 (200—400 меш) и анализировали методом микроколоночной хроматографии на лихросорбе- $NH_2$ . Для доказательства структуры полученных фосфамидов проводили избирательный гидролиз фосфамидной связи (15% водная  $C_8H_9O_3$ , 5 мин, 95° С), в результате которого методом микроколоночной хроматографии регистрировали регенерацию исходного олигонуклеотида. Кроме того, полученные фосфамиды не гидролизировались фосфомоноэстеразой, что также подтверждает наличие в них амидной группы по 5'- или 3'-концевому фосфатному остатку.

Предложенный метод получения фосфамидов олигонуклеотидов отличается высокой селективностью, так как реакция протекает исключительно по фосфомоноэфирной группе олигонуклеотидов. Метод пригоден для получения как 3'-, так и 5'-фосфамидов олигодезоксирибонуклеотидов. Поскольку 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид в воде не образует аддуктов по межнуклеотидным фосфатным группам, становится возможным получение производных олигонуклеотидов риборяда по 5'-концевой фосфатной группе без расщепления и изомеризации межнуклеотидных связей. В случае 3'-фосфатов олигорибонуклеотидов возможно протекание внутримолекулярного фосфорилирования концевой 2'-ОН-группы, если она не блокирована. Если же предварительно проацелировать оксигруппы олигорибонуклеотидов, а затем провести конденсацию с амином в присутствии 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимида, то можно надеяться, что и 3'-фосфамиды олигорибонуклеотидов станут доступными.

Предложенный метод экспериментально прост, так как позволяет работать с водорастворимыми солями моно- и олигонуклеотидов и не требует защиты экзоциклических аминогрупп олигонуклеотидов.

Высокая эффективность и простота метода позволили нам получать соединения, которые были практически недоступны ранее, например имидазолиды олигонуклеотидов, являющиеся эффективными фосфорилирующими агентами в водной среде [14].

Следует отметить, что метод оказался неподходящим для прямого получения фосфамидов конденсацией олигонуклеотидов с диаминами, поскольку в этом случае протекает побочная реакция незамещенной аминогруппы фосфамида с карбодимидом с образованием гуанидинневых производных. В этом случае оказалось удобным использовать фосфорилирующую способность легко получаемых фосфоимидазолидов. При обработке имидазолидов моно- и олигонуклеотидов 100-кратным избытком тетраметилендиамина в воде при 50° С за 24 ч с выходом 90 и 75% соответственно были получены  $[H_2N(CH_2)_4NH]pdT$  и  $d(TTGAATG)p \cdot [NH(CH_2)_4NH_2]$ .

Таким образом, предложенный метод позволяет получать фосфамидные производные как моно-, так и олигонуклеотидов практически любой длины и состава.

Одностадийность и простота эксперимента позволяют рекомендовать метод для работы с радиоактивно мечеными препаратами, а также микроколичествами синтетических и природных фрагментов ДНК и РНК.

### Экспериментальная часть

В работе использованы  $d(TTGAATGp)$ , синтезированный нами ранее [15],  $(pA)_7$  любезно предоставлен В. К. Райтом (НИС НГУ), 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид, имидазол, морфолин, метиловый эфир глицина, бензиламин, Lichrosorb-NH<sub>2</sub> — препараты фирмы Merck (ФРГ), 1,4-диаминобутан (Koch-Light, Великобритания), анилин, *n*-бутиламин (Союзреактив),  $pdT$  производства СКТБ БАВ (Новосибирск). Электрофорез на бумаге FN-1 (ГДР) выполняли на приборе Labor (Венгрия) при напряжении 900–1000 В в 0,05 М ТЕАВ, рН 8,5, в течение 1,5 ч. Микроколоночную хроматографию проводили на колонках (1×50 мм) с лихросорбом-NH<sub>2</sub> в линейном градиенте натрий-фосфатного буфера, рН 7,5, в 7 М мочевины с использованием жидкостного хроматографа МКСФП-4 (НИОХ АН СССР, Новосибирск). Колоночную хроматографию проводили аналогично на колонках размером 3×100 мм.

*Общая методика получения фосфамидов моно- и олигонуклеотидов.* Водный раствор амина (50 мкл 3 М раствора), предварительно титрованный 6 н. водн. HCl до значения рН на единицу меньше  $pK_a$  амина, добавляли к водорастворимой соли моно- или олигонуклеотида (0,01–1 мкмоль). К полученной смеси добавляли 4,8 мг (25 мкмоль) EDC и реакционную смесь выдерживали при 20° С в течение времени, указанного в табл. 2. Если конденсацию проводили при рН, меньших 7,0–7,5, то полученные фосфамиды мононуклеотидов выделяли электрофорезом на бумаге, фосфамиды олигонуклеотидов — колоночной хроматографией. При проведении конденсации при рН, больших 7,5, по окончании реакции к реакционной смеси добавляли 20-кратный по объему избыток 25% водного раствора аммиака. Через 15–20 ч инкубирования смеси при 20° С избыток аммиака удаляли упариванием и полученные фосфамиды выделяли указанными методами.

$[H_2N(CH_2)_4NH]pdT$  и  $d(TTGAATG)p[NH(CH_2)_4NH_2]$ . Полученные по предыдущей методике имидазолиды  $pdT$  или  $d(TTGAATG)p$  (0,01–1 мкмоль) растворяли в 90 мкл воды и добавляли 8,8 мг (100 мкмоль) 1,4-диаминобутана. Смесь инкубировали 20–24 ч при 50° С. Полученный  $[H_2N(CH_2)_4NH]pdT$  выделяли электрофорезом на бумаге,  $d(TTGAATG)p \cdot [NH(CH_2)_4NH_2]$  выделяли колоночной хроматографией на лихросорбе-NH<sub>2</sub>. Структуру полученных соединений доказывали аналогично описанному в работе [16].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Ломакина Т. С., Шелпакова Е. Л., Чемасова А. Н., Гринсва Н. И. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 1, с. 70–80.
2. Мишенкина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 2, с. 179–188.
3. Shabarova Z. A., Prokofiev M. A. FEBS Lett., 1970, v. 11, p. 237–240.
4. Юодка Б. А. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1445–1465.
5. Воробьев О. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1964, т. 158, № 1, с. 143–146.
6. Young R. J., Khorana H. G. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 2, p. 244–245.
7. Shutyantseva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, № 4, p. 903–916.
8. Самуков В. В. Селективная модификация концевых фосфатных групп в нуклеотидах и олигонуклеотидах. Дис. ... канд. хим. наук. Новосибирск: ВНИИМБ, 1980, с. 55–72.
9. Корана Г. Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты. М.: Мир, 1964, с. 146–162.
10. Дженкс У. Р. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972, с. 63, 79.
11. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976, с. 73.
12. Брюс Т., Бенкович С. Механизмы биоорганических реакций. М.: Мир, 1970, с. 85.
13. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шибачев В. И. Органическая химия нуклеиновых кислот / Ред. Кочетков Н. К. М.: Химия, 1970, с. 383–384.
14. Orgei L. E., Lohrmann R. Acc. Chem. Res., 1974, v. 7, № 2, p. 368–377.
15. Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Вейко В. П., Шабарова З. А. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1310–1317.
16. Ивановская М. Г., Поздняков П. П., Зельцер П. Э., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1977, т. 236, № 4, с. 1022–1024.

Поступила в редакцию

28.I.1983

После доработки

25.II.1983

## SYNTHESIS OF PHOSPHORAMIDATES OF MONO- AND OLIGONUCLEOTIDES IN AQUEOUS MEDIA

GOTTICH M. B., IVANOVSKAYA M. G., SHABAROVA Z. A.

*Chemistry Department, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

An efficient method of obtaining phosphoramidates of mono- and oligonucleotides in aqueous media has been developed. The method is based on condensation of a nucleotide component with any primary or secondary amine in the presence of 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide. Condensation is carried out at pH one unit less than  $pK_a$  value of reacting amine to yield mono- and oligonucleotide phosphoramidates in 85–100% yield. Condensation takes about 0.5–4 hours in case of amines with  $pK_a < 8$  and 4–20 hours for amines with  $pK_a > 8$ . The method can be used for the synthesis of 3'- and 5'-phosphoramidates of oligodeoxyribonucleotides and 5'-phosphoramidates of oligoribonucleotides.