



УДК 577.113.6

## МНОГОЦЕЛЕВОЙ РЕАГЕНТ ДЛЯ СИНТЕЗА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 1995 г. М. С. Щепинов, В. Г. Коробко, В. Н. Добрынин

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, В-437, ГСП-7, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 13.07.94 г.

Осуществлен синтез фосфитамидного производного 2-диметокситритилокси-2'-гидроксиэтилдисульфида, являющегося удобным реагентом для синтеза различных производных олигонуклеотидов по фосфитамидной схеме. С помощью нового реагента получены 3'- и 5'-фосфаты, 3'-тиоолигонуклеотиды, 5'-тиоолигонуклеотиды, алкилтиофосфатные и дисульфидные производные олигонуклеотидов. Оценена устойчивость алкилтиофосфатной и дисульфидной связей в олигонуклеотидах к воздействию нитрата серебра и дитиотреита. Структура фосфитамидного реагента и олигонуклеотида, содержащего алкилтиофосфатную связь, подтверждена методами ЯМР-спектроскопии.

*Ключевые слова: олигонуклеотиды модифицированные, синтез; размыкаемые синтоны для олигонуклеотидного синтеза; 3'-фосфаты, 5'-фосфаты, 3'-тиоолигонуклеотиды, 5'-тиоолигонуклеотиды, ахиральные алкилтиофосфаты, дисульфиды.*

Ряд прикладных задач биоорганической химии может быть решен путем введения в биополимеры специальных размыкаемых элементов, способных селективно расщепляться под действием химических реагентов, не взаимодействующих с самим биополимером. При помощи таких "размычек" получают пептиды, белки, фрагменты нуклеиновых кислот, связанные между собой [1 - 5] либо содержащие различные репортерные группы, которые в случае необходимости можно удалить [6 - 8]. Например, биотин, флуоресцеин и другие метки часто присоединяют к олигонуклеотидам через спейсеры различной длины, содержащие размыкаемый элемент [9 - 11]. Разветвленные олигонуклеотиды, содержащие размыкаемые вставки, используются при амплификации ДНК [12], а также для мультиплексного секвенирования ДНК [13]. Описано использование размычек в исследовании неустойчивых вторичных структур ДНК [14, 15].

Ранее для манипулирования с ДНК мы синтезировали на покрытый стрептавидином полимерный носитель и биотинилированные олигонуклеотиды, содержащие между нуклеотидной последовательностью и остатком биотина диольную вставку, расщепляемую при обработке перйодатом натрия [16]. Однако в некоторых случаях возникает необходимость иметь дополнительный размыкаемый элемент, устойчивый к действию

$\text{NaIO}_4$  и расщепляемый в иных условиях, также не нарушающий целостность олигонуклеотида. Набор из двух (и более) размычек позволил бы осуществить селективное отщепление одних фрагментов ДНК, сохраняя другие в иммобилизованном виде.

За основу такого размыкаемого элемента мы выбрали 2,2'-дитиодиэтанол (II), дисульфидную группировку которого можно селективно расщеплять при помощи мягких восстановителей, таких, как комплексные гидриды, меркаптаны и др. [17].

Очевидно, что размыкаемый элемент должен быть достаточно устойчивым в условиях олигонуклеотидного синтеза. С одной стороны, известно, что фосфиты и фосфины обладают высоким сродством к атому серы и способны вызывать разрыв дисульфидных связей, окисляясь в соответствующие тиофосфаты [18]. Кроме того, стадия окисления йодом в процессе твердофазного амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов также может приводить к расщеплению дисульфида [19]. С другой стороны, в последнее время появился ряд работ, свидетельствующих об относительной устойчивости дисульфидной связи в процессе твердофазного синтеза олигонуклеотидов по амидофосфитной и даже по Н-фосфонатной схемам. Большая часть этих публикаций посвящена синтезу носителей на основе пористых стекол, содержащих дисульфидную связь между первым нуклеозидом и носителем и предназначенных для синтеза 3'-фосфатов и олигонуклеотидов с 3'-концевой реакционноспособной SH-группой

Использованные сокращения: CPG – стекло с контролируемым размером пор, DMTg – 4,4'-диметокситритил. В буквенных формулах префикс "d" везде опущен.

[20 - 27]. Описаны также модифицированные олигонуклеотиды с дисульфидной связью в боковой цепи – в составе цистаминового остатка, связанного с межнуклеотидным фосфатом [28], а также в составе линкеров, присоединенных к модифицированным гетероциклическим основаниям [10, 11, 29]. Во всех случаях не отмечено сколько-нибудь заметного разрушения S–S-связи в процессе олигонуклеотидного синтеза.

Опираясь на эти данные, мы осуществили синтез амидофосфитного синтона (IV) (схема 1), содержащего дисульфидную связь. Для этого сначала обработкой пероксидом водорода провели окислительную димеризацию меркаптоэтанола (I). Образовавшийся диол (II) монотритилировали диметокситритилхлоридом с образованием спирта (III), который затем фосфитилировали по стандартной методике до соединения (IV). Следует отметить, что максимальный выход конечного продукта был достигнут при проведении реакции фосфитирования при 0°C в течение 1.5 ч [30]. При повышении температуры или увеличении продолжительности реакции значительно увеличивался выход продуктов окисления, в том числе внутримолекулярного, атома фосфора (масс-спектр такой реакционной смеси содержал значительно больше сигналов, один из которых ( $m/z$  83) соответствовал тирану). Эффективность конденсации реагента (IV) в процессе твердофазного синтеза составила 85 - 87% (определена по поглощению  $\text{DMTr}^+$ -катиона) и сохранялась на этом уровне в течение 1 сут. В то же время амидит (IV) полностью сохранял реакционную способность в течение года при хранении в твердом виде при -20°C.

Свойство дисульфидной вставки расщепляться под действием восстанавливающих реагентов было оценено на модельном олигонуклеотиде (5') (T)<sub>8</sub>p-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>p(T)<sub>16</sub> (V), полученном с общим выходом (после выделения) 35%. Расщепление осуществляли обработкой 0.35 М раствором дитиотрепта в воде и продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины (рис. 1). Время полного расщепления олигонуклеотида (V) на составляющие его тиолы (VI) и (VII) составило 35 - 50 мин.

Полученный реагент (IV) позволяет синтезировать модифицированные олигонуклеотиды, содержащие не только дисульфидные, но и алкилтиофосфатные связи, устойчивые в условиях фосфитамидного синтеза и окисления йодом, а также обработки тиолами, но способные селективно расщепляться под действием солей тяжелых металлов, например серебра и ртути [31]. Для синтеза олигонуклеотидов, содержащих P–S-связку, синтон (IV) в процессе твердофазного синтеза конденсировали с растущей цепью по 5'-гидроксила по стандартному протоколу. После стадий кэпирования и окисления через колонку с носителем в

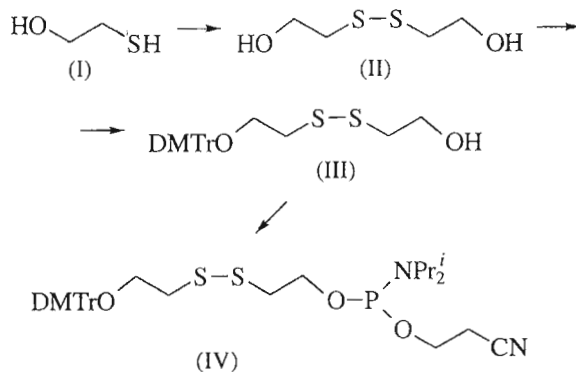


Схема 1. Синтез O<sup>1</sup>-диметокситритил-O<sup>6</sup>-(N,N-диизопропиламино-2-цианэтоксифосфинил)-3,4-дитиа-1,6-гександиола (IV).

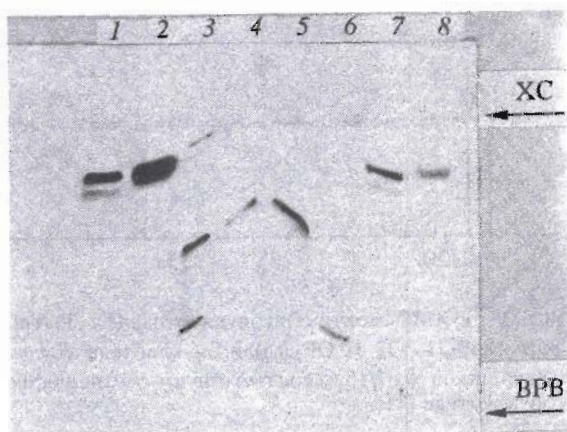
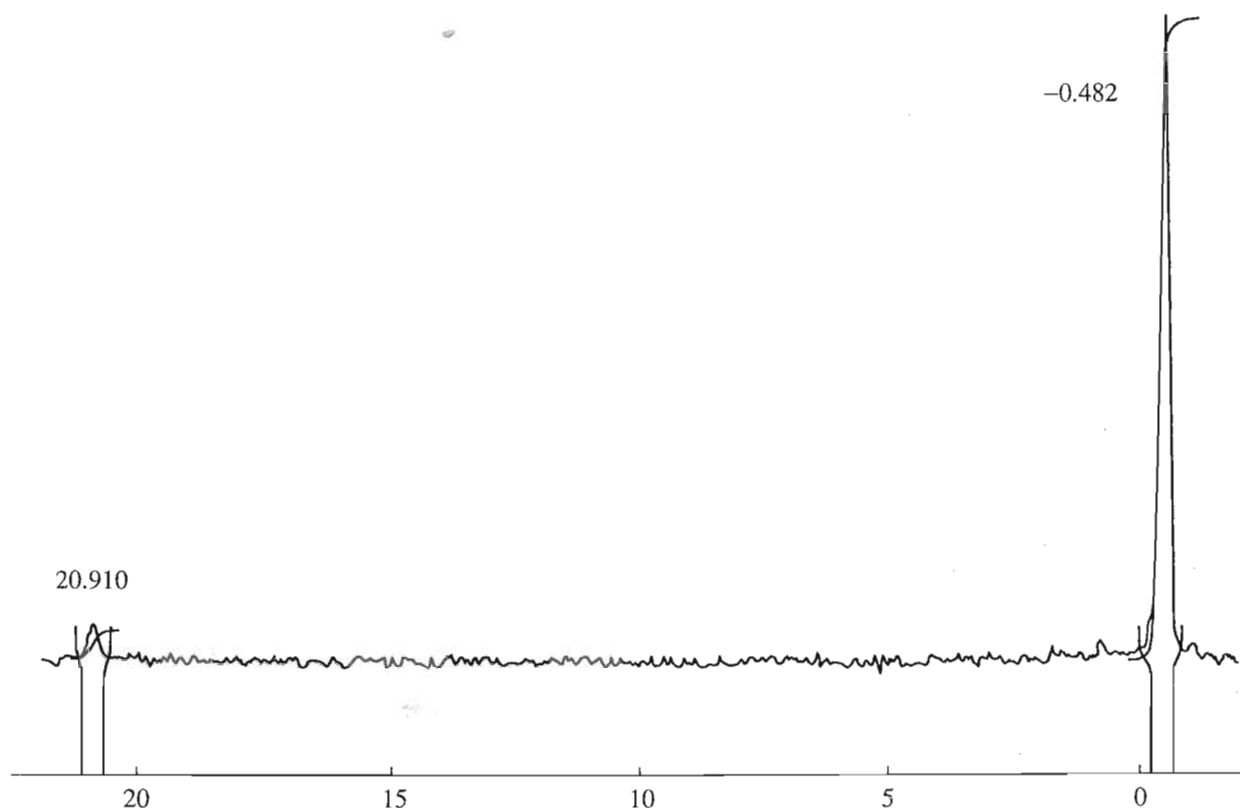


Рис. 1. Анализ продуктов расщепления олигонуклеотидов (V) и (VIII) дитиотрептом и нитратом серебра в условиях денатурирующего гель-электрофореза (20% ПААГ, 7 М мочевины, визуализация в отраженном УФ): 1 – олигонуклеотид (V); 2 – олигонуклеотид (VIII); 3 – (V) + DTT, 45 мин; 4 – (VIII) + AgNO<sub>3</sub>, 20 мин; 5 – T<sub>16</sub>; 6 – T<sub>8</sub>; 7 – (V) + AgNO<sub>3</sub>, 5 мин; 8 – (VIII) + DTT, 45 мин. XC и BPB – положения маркерных красителей ксиленцианола и бромфенолового синего.

течение 50 мин пропускали 0.5 М раствор дитиотрепта в ацетонитриле (условия см. в “Экспериментальной части”). Последующая конденсация свободных SH-групп с амидофосфитными производными защищенных нуклеозидов или биотинола [16] и окисление приводили к образованию алкилтиофосфатной связи (для достижения 90% выхода на стадии конденсации время конденсации было увеличено до 5 мин). Наличие P–S-связи в модельном олигонуклеотиде (5') (T)<sub>7</sub>Tr(S)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>p(T)<sub>16</sub> (VIII), полученном с общим выходом 30%, было подтверждено при помощи <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии (рис. 2).

Способность дисульфидной и алкилтиофосфатной шивок служить в качестве независимых



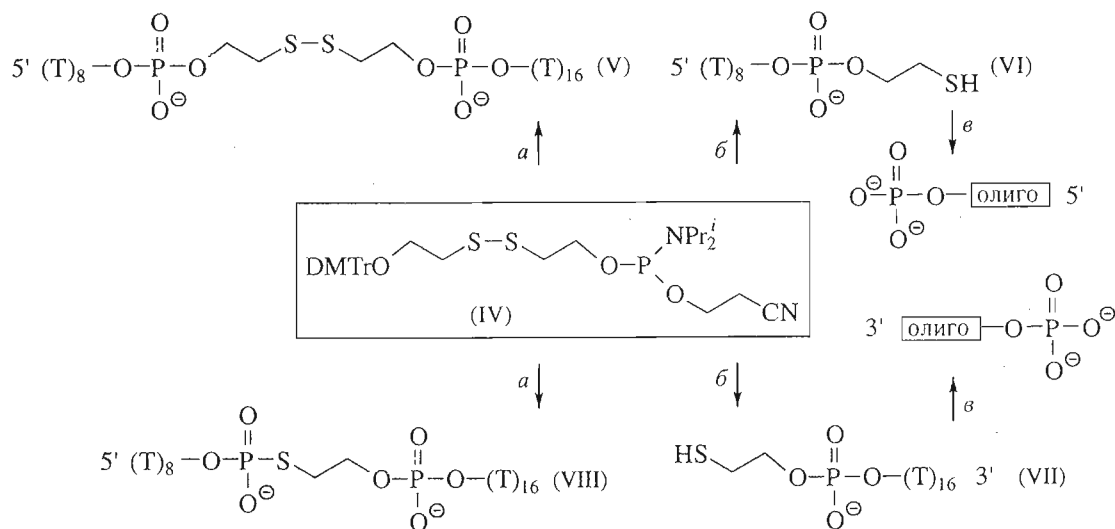
**Рис. 2.**  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектр олигонуклеотида (5') (Т) $_7$ Тр(S)- $\text{CH}_2\text{CH}_2$ -р(Т) $_{16}$  (VIII) в  $\text{D}_2\text{O}$  при 303К (шкала  $\delta$ , внешний стандарт – 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 10  $\text{OE}_{260}$  олигонуклеотида в 0.6 мл, без развязки протонов, 52 274 накопления). Соотношения площадей пиков (0.57/13.6) соответствуют соотношению количества алкилтиофосфатного и фосфатных остатков в олигонуклеотиде [31].

размыкаемых элементов в модельных олигонуклеотидах (V) и (VIII) была оценена путем их обработки соответственно водными растворами дитиотреита и  $\text{AgNO}_3$  (условия см. в “Экспериментальной части”) и анализа образующихся продуктов при помощи электрофореза в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины (рис. 1).

Как уже отмечалось, дисульфидсодержащие линкеры ранее использовались для получения олигонуклеотидов с 3'-концевыми сульфгидрильными группами, способными легко алкилироваться различными галогенсодержащими реагентами [23 - 27]. Описано также получение олигонуклеотидов, несущих сульфгидрильные группы на 5'-конце [32, 33]. Предлагаемый нами реагент позволяет получать производные, содержащие меркаптоэтилфосфатные группы как на 5'-, так и на 3'-конце олигонуклеотида. Так, например, 5'-меркаптоэтилфосфатное производное олигонуклеотида (VII) получали в процессе олигонуклеотидного синтеза конденсацией реагента (IV) с растущей цепью по 5'-гидроксильной группе, выделяя его затем в DMTr-форме и обрабатывая раствором дитиотреита. Для синтеза 3'-меркаптоэтилфосфатных производных описано применение спирта (III), иммобилизованного на СРГ

[20, 23, 26, 27]. Реагент (IV) позволяет пользоваться для этих целей любым носителем, устойчивым в условиях олигонуклеотидного синтеза и содержащим гидроксильные или DMTr-О-группы: после конденсации такого носителя с синтоном (IV) ведут синтез олигонуклеотида по стандартной методике. Аммонолиз и последующая обработка дитиотреитом приводят к получению 3'-меркаптоэтилфосфатного производного олигонуклеотида (например, (VI)). Электрофоретическая подвижность 5'- и 3'-меркаптоэтилфосфатных производных олигонуклеотидов показана на рис. 1.

Олигонуклеотиды, содержащие на 5'- или 3'-конце фосфатную группу, широко используются для самых разных целей. Для получения 5'-фосфатов помимо ферментативной реакции кинирования описан ряд синтонов ненуклеозидной природы, представляющих собой по сути дела защитные группы для остатка фосфорной кислоты, удаляемые в мягких условиях после синтеза [34 - 37]. Многие описанные синтоны содержат DMTr-группу, облегчающую выделение конечного продукта и улучшающую растворимость исходного синтона в ацетонитриле. Для получения 3'-фосфатов обычно синтезируют олигодезоксирибонуклеотиды с



**Схема 2.** Примеры превращения синтона (IV) в олигонуклеотиды, содержащие алкилтиофосфатный и дисульфидный размыкаемые элементы (а); в олигонуклеотиды, содержащие на 5'- и 3'-концах сульфидрильные группы (б) и 5'- и 3'-фосфатные остатки (в). [олиго] – остаток олигонуклеотида.

3'-концевым рибозвеном, которые после обработки периодатом натрия и аммонолиза превращаются в соответствующие 3'-фосфаты. Кроме того, как указывалось выше, в последнее время часто используют модифицированные твердофазные носители, позволяющие после соответствующей обработки получать олигонуклеотиды с 3'-меркаптоэтилфосфатной группой, которая при аммонолизе подвергается  $\beta$ -элиминированию с образованием олигонуклеотид-3'-фосфата.

При помощи описываемого нами синтона можно легко получать и 5'-, и 3'-фосфорилированные производные олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды с 5'- или 3'-меркаптоэтилфосфатными группами, полученные при помощи реагента (IV), при щелочной обработке превращаются в соответствующие фосфаты [20, 23, 32] (схема 2).

Таким образом, нами предложен реагент, позволяющий в результате простых операций получать целый ряд полезных производных олигонуклеотидов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали 2-меркаптоэтанол (Merck, Германия), дитиотреит (Keanal, Венгрия); остальные реактивы отечественного производства. Пиридин и ацетонитрил (ос. ч.) кипятили над  $\text{CaH}_2$  и перегояли. Бис-*N,N*-диизопропиламино-2-цианэтилфосфит и тетразолид диизопропиламиния синтезировали как описано в работах [38, 39].

Спектры  $^1\text{H}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР регистрировали на приборе Bruker AC-500 (500 МГц) в  $\text{CDCl}_3$  (шкала  $\delta$ ); олигонуклеотиды получали на синтезаторе 380В (Applied Biosystems, США) с использованием

приготовленных в лаборатории реагентов [38], выделяли при помощи ВЭЖХ и анализировали методами ионообменной хроматографии и электрофореза в 20% ПААГ; высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на приборе Beckman-314; масс-спектры FAB получены на приборе Kratos MS50TC.

Для ТСХ использовали пластинки Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Merck) и системы хлороформ (А), хлороформ-триэтиламин, 99 : 1 (Б). Для колоночной хроматографии использовали силикагель MN-Kieselgel 60 (Macherey & Nagel, Германия).

**2-Гидроксиэтилдисульфид (II).** К 5 мл (0.071 моль) 2-меркаптоэтанола (I) в течение 1 ч при 5°C прибавляли по каплям 7.8 мл (0.077 моль в пересчете на  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% раствора пероксида водорода в воде. Через 8 ч, убедившись в отсутствии перекиси (тест с  $\text{Cu}_2\text{Cl}_2$  [41]), реакционную смесь упаривали на роторном испарителе и фракционировали перегонкой в вакууме при 1 мм рт. ст. Основную фракцию отгоняли при 135°C. Выход 4.5 г (80%) продукта в виде прозрачной жидкости,  $d$  1.26.  $R_f$  0.23 (система А, проявление йодом). Масс-спектр,  $m/z^+$ : 77, 154 (M).

**2-Диметокситрилокси-2'-гидроксиэтилдисульфид (III)** синтезировали как описано в работе [41].

**О<sup>1</sup>-Диметокситриил-О<sup>6</sup>-(*N,N*-диизопропиламино-2-цианэтилфосфинил)-3,4-дитиа-1,6-тександиол (IV).** 1 г (2.2 ммоль) спирта (III) сушили 24 ч в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$ , затем под аргоном перенесли в 15 мл сухого хлористого метилена, добавляли 0.38 г (2.2 ммоль) сухого тетразолида диизопропиламиния, 0.66 мл (2.2 ммоль) бис-*N,N*-диизопропиламино-2-цианэтилфосфита и перемешивали в

присутствии каталитического количества диацетилциклодифитотреита под аргоном 1.5 ч при 0°C. Затем реакционную смесь промывали 50 мл насыщенного раствора NaHCO<sub>3</sub>, сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), упаривали, растворяли в 50 мл ацетонитрила, охлаждали до 5°C и быстро промывали (2 × 15 мл) холодным гексаном. Ацетонитрильную фракцию упаривали, быстро чистили при 5°C на колонке с силикагелем (система Б) и сутки сушили в вакууме (при 0.04 Торр). Получали 0.8 г (55%) бесцветного масла, которое хранили при -20°C. R<sub>f</sub> 0.85 (система Б). Масс-спектр, m/z<sup>+</sup>: 303, 456 (M). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, м. д.): 7.6 - 6.7 (м, 13H, аром.), 4.12 (м, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 3.78 (с, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.38 (м, 2H, PNCH), 3.01 (т, 2H, J 6 Гц, DMTrOCH<sub>2</sub>), 2.85 - 2.67 (м, 6H, CH<sub>2</sub>SSCH<sub>2</sub>, POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 2.52 (т, 2H, CH<sub>2</sub>CN), 1.4 - 1.2 (м, 12H, CHCH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 146.053.

**Расщепление олигонуклеотидов с дисульфидной вставкой и синтез алкилтиофосфатного фрагмента. а) В растворе.** 1 ОЕ<sub>254</sub> лиофилизованного олигонуклеотида (V) растворяли в 50 мкл 0.35 М раствора дитиотреита в воде при 20°C. Через 35 - 50 мин реакционную смесь обессоливали на колонке (10 × 0.6 см), заполненной гелем Toyopearl TSK HW-40, и анализировали на 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

**б) На носителе.** Через колонку для твердофазного синтеза ДНК (0.2 мкмоль, Applied Biosystems, США), заполненную CPG с привитым олигонуклеотидом, содержащим на 5'-конце дисульфидную "размычку" с DMTr-группой, в течение 50 мин пропускали 0.5 М раствор дитиотреита в ацетонитриле (время было определено по поглощению DMTr<sup>+</sup>-катиона: при полном расщеплении дисульфидной вставки носитель не должен содержать DMTr-групп). Носитель промывали сухим ацетонитрилом (3 × 15 мл), затем через колонку пропускали амидофосфитный реагент в присутствии тетразола (время конденсации было увеличено до 5 мин). Дальнейший синтез осуществляли по стандартному протоколу.

**Расщепление олигонуклеотидов, содержащих алкилтиофосфатную вставку.** 1 ОЕ<sub>254</sub> лиофилизованного олигонуклеотида (VIII) растворяли в 10 мкл 50 мМ водного раствора AgNO<sub>3</sub> при 20°C. Через 20 мин добавляли 1 мкл 0.15 М водного раствора дитиотреита и выпавший осадок серебряной соли удаляли центрифугированием. Реакционную смесь обессоливали на колонке (10 × 0.6 см), заполненной гелем Toyopearl TSK HW-40, и анализировали на 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Авторы благодарны Т.А. Балашовой за регистрацию <sup>1</sup>H- и <sup>31</sup>P-ЯМР-спектров и Ю.П. Козьмину за регистрацию масс-спектров.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gordon R.D., Fieles W.E., Schotland D.L., Hogue-Angeletti R., Barchi R.L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 308 - 312.
- Traut R.R. // Protein Function, a Practical Approach / Ed. T.E. Creighton. IRL Press, 1989. P. 101.
- Harlow E. // Antibodies: a Laboratory Manual. N.Y.: Coldspring Harbor, 1988. P. 562.
- Corey D.R., Zuckermann R.N., Schultz P.G. // Bioorganic Chemistry Frontiers. B.: Springer-Verlag, 1991. V. 2.
- Chmielewski J., Schultz P. // Tetrahedron. 1991. V. 47. № 14/15. P. 2563.
- Kozikowski A.P., Tuckmantel W. // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 35. P. 4613 - 4616.
- Ghebrehiwet B. // J. Immunol. Meth. 1988. V. 110. P. 251.
- Lin W.-Ch., Morton Th.H. // J. Org. Chem. 1991. V. 56. № 24. P. 6850 - 6856.
- Englisch U., Gauss D.H. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1991. V. 30. № 6. P. 613.
- Mitchell L., Merril C. // Anal. Biochem. 1989. V. 178. P. 239.
- Chehab F., Kan Y. // Blood. 1988. V. 72. P. 57A.
- Horn T., Chang C.-A., Fultz T. J., Ahle D., Hamren S. J., Urdea M. S. // Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 24. P. 201 - 202.
- Koster H., Beck S., Coull J.M., Dunne T., Gildea B.D., Kissinger C., Keefe Th.O. // Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 24. P. 318 - 321.
- Glick G.D. // J. Org. Chem. 1991. V. 56. P. 6746.
- Ferentz A.E., Verdine G.L. // J. Amer. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 4000 - 4002.
- Щепинов М.С., Есипов Д.С., Коробко В.Г., Добрынин В.Н. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. № 8 - 9. С. 955 - 966.
- Lamoureux G.V., Whitesides G.M. // J. Org. Chem. 1993. V. 58. № 3. P. 633 - 641.
- Курби А., Уоррен С. Органическая химия фосфора. М.: Мир, 1971.
- Оаэ С. Органическая химия серы. М.: Мир, 1976.
- Zuckermann R., Corey D., Schultz P. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 13. P. 5305 - 5321.
- Gupta K.C., Sharma P., Sathyanarayana S., Kumar P. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 17. P. 2471 - 2474.
- Asseline U., Thuong N.T. // Nucleosides and Nucleotides. 1991. V. 10. № 1 - 3. P. 359 - 362.
- Gupta K.C., Sharma P., Kumar P., Sathyanarayana S. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 11. P. 3019 - 3025.
- Guzaev A.P. // Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1991. № 24. P. 236.
- Bonfils E., Thuong N.T. // Tetrahedron Lett. 1991. V. 32. № 26. P. 3053 - 3056.
- Kumar A. // Nucleosides and Nucleotides. 1993. V. 12. № 5. P. 441 - 448.
- Kumar A. // Nucleosides and Nucleotides. 1993. V. 12. № 7. P. 729 - 736.
- Fidanza J.A., McLaughlin L.W. // J. Org. Chem. 1992. V. 57. P. 2340.

29. Ferentz A.E., Verdine G.L. // J. Amer. Chem. Soc. 1991. V. 113. № 10. P. 4000 - 4002.
30. Pei D., Ulrich H.D., Schultz P.G. // Science. 1991. V. 253. № 5026. P. 1408 - 1411.
31. Mag M., Luig S., Engels J.W. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 7. P. 1437 - 1441.
32. Connolly B.A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 12. P. 4485 - 4502.
33. Mori K., Subasinghe C., Stein C.A., Cohen J.S. // Nucleosides and Nucleotides. 1989. V. 8. № 5/6. P. 649 - 657.
34. Urdea M.S., Horn T. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 4705.
35. Uhlmann E., Engels J. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 1023.
36. Филиппов С.А., Есипов Д.С., Калиниченко С.В., Добрынин В.Н. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 527 - 529.
37. Celebuski J.E., Chan C., Jones R.A. // J. Org. Chem. 1992. V. 57. P. 5535 - 5538.
38. Caruthers M.H., Barone A.D., Beaucage S.L., Dodds D.R., Fisher E.F., McBride L.J., Matteucci M., Stabinsky J., Tang J.-Y. // Meth. Enzymol. 1987. V. 154. P. 287 - 313.
39. Nielsen J., Dahl O. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 11. P. 3626.
40. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach / Ed. F. Eckstein. Oxford, New York, Tokyo: IRL Press, 1991. P. 297.
41. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976. С. 445.

## A Versatile Reagent for the Synthesis of Modified Oligonucleotides

M. S. Shchepinov, V. G. Korobko, and **V. N. Dobrynin**

*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow*

**Abstract** – A phosphoramidite derivative of 2-dimethoxytrityloxy-2'-hydroxyethyl disulphide was synthesised and shown to be a useful reagent for the synthesis of different oligonucleotide derivatives by phosphoramidite approach, 3',5'-phosphates, 3',5'-thiooligonucleotides, alkylthiophosphate and disulphide-containing oligonucleotides were obtained using the reagent described. The stability of alkylthiophosphate and disulphide linkages towards AgNO<sub>3</sub> and DTT was estimated. Structures of compounds obtained were confirmed by NMR-spectroscopy.

*Key words: modified oligonucleotides, cleavable synthons, 3'-phosphates, 5'-phosphates, 3'-thiooligonucleotides, 5'-thiooligonucleotides, alkylthiophosphates, disulphides.*

Post address: Laboratory of Gene Chemistry, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Ul. Miklukho-Maklaya 16/10, V-437, Moscow, GSP-7, 117871, Russia.