



УДК 547.963.32.07

## ТИОФОСФАТНЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

II\*. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА 5'-S-ТИОФОСФАТНЫХ АНАЛОГОВ  
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ*Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф.,  
Баранова Л. В., Ривкин М. И., Рыбаков В. Н.**Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск*

Разработан общий метод синтеза 5'-S-тиофосфатных аналогов олигодезоксинуклеотидов, содержащих не природные P—S—C5'-межнуклеотидные связи, основанный на реакции нуклеофильного замещения между 2'-дезоксинуклеозид-3'-тиофосфатами и 2',5'-дидезокси-5'-иднуклеозид-3'-O-(S-β-цианэтил)тиофосфатами или 2',5'-дидезокси-5'-иднуклеозидами в диметилформамиде или смесях его с водой. Обнаружена зависимость константы скорости первого порядка данной реакции от природы противокатионов и длины тиофосфатного компонента. Найдено, что константа скорости уменьшается в рядах  $Li^+ > Na^+ > K^+ > Bu_4N^+$  и  $(Tr_s) > (Tr_s)_2 > (Tr_s)_3$ . Синтезированы следующие 5'-S-тиофосфатные аналоги олигодезоксинуклеотидов: T-(sT)<sub>8</sub>, T-(sT)<sub>3</sub>-sG-sC-(sA)<sub>2</sub>, C-(sA)<sub>3</sub>-sT-(sG)<sub>2</sub>-(sA)<sub>3</sub>, G-sG-sA-sT-(sG)<sub>2</sub>-sA-sT-sG-sT-(sA)<sub>2</sub>. Первые два аналога комплементарны 3'-концевому участку глобиновой мРНК кролика, последние два являются аналогами соответствующих участков кодирующей цепи синтетического гена ангиотензина I. Синтез указанных аналогов осуществлен без выделения промежуточных продуктов хроматографическими методами, выходы целевых продуктов составили 12–36% в расчете на исходные мономеры. Разработан метод анализа нуклеотидной последовательности в синтезированных аналогах.

Аналоги нуклеиновых кислот представляют интерес в качестве удобных инструментов для исследования ферментов их метаболизма [2] и как потенциальные противовирусные препараты [3]. Тиофосфатные аналоги нуклеиновых кислот являются одними из наиболее перспективных соединений этого класса ввиду минимальности произведенных в них структурных изменений. В зависимости от положения атома серы в межнуклеотидном тиофосфатном остатке можно выделить три группы монотиофосфатных аналогов: 1) 3'-S-тиофосфатные аналоги, содержащие C3'—S—P-связи, 2) 5'-S-тиофосфатные аналоги, содержащие P—S—C5'-связи, 3) тиофосфатные аналоги, содержащие связи типа O—P(S)—O. Аналоги первой группы, по-видимому, пока еще не получены. Представители последней группы, полученные Экштейном и др. [4, 5], показали широкий спектр биологической активности, в том числе матричные свойства [6] и интерферогенную активность [7].

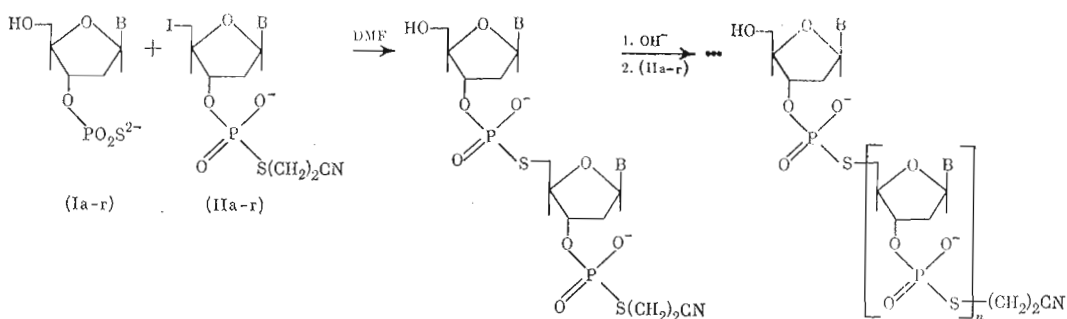
5'-S-Тиофосфатные аналоги гораздо менее изучены, хотя первый представитель таких соединений был получен Микельсоном в 1962 г. [8]. Аналоги этой группы отличаются от природных прототипов несколько большей длиной межнуклеотидной связи и, возможно, конформацией углеводных остатков [9], что не мешает им, по имеющимся данным [10], образовывать вторичную структуру, близкую к структуре природных нуклеиновых кислот, и комплементарно взаимодействовать как друг с другом, так и с синтетическими полинуклеотидами [11]. Сочетание этих свойств с большей устойчивостью к ферментативному гидролизу [12] и способностью к мягкому расщеплению под действием окислителей [13], а также легкая доступность таких соединений, связанная с возможностью их синтеза при помощи реакций нуклеофильного замещения [13], делает 5'-S-тиофосфатные аналоги нуклеиновых кислот весьма перспективными объектами для

\* Сообщение I см. [1]. Префикс d в сокращенном написании 2'-дезоксинуклеозидов для краткости всюду опущен. Используются следующие сокращения: sN — 2',5'-дидезокси-5'-меркаптонуклеозид, p<sub>s</sub> — тиофосфат, Ibu — изобутирил, DMF—N,N-диметилформамид.

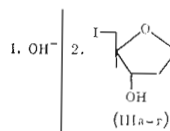
биохимических исследований и, возможно, заместителями синтетических олигонуклеотидов в ряде процессов [14]. Но до настоящего времени данные соединения остаются малоизученными, главным образом ввиду отсутствия эффективного метода их синтеза.

Хладек и Нэшвари [13] предложили использовать для синтеза тиофосфатных аналогов олигонуклеотидов реакцию нуклеофильного замещения между 2'-дезоксирибонуклеозид-3'-тиофосфатами и 5'-активированными нуклеотидами, например 5'-О-тозилнуклеозид-3'-О-(S-β-цианэтил)тиофосфатами в DMF, но трудности, встретившиеся при реализации этой внешне привлекательной схемы, не были преодолены [10]. В частности, неудачным оказался выбор *n*-толуилсульфонилоксигруппы в качестве уходящей вследствие малой реакционной способности соответствующих производных (особенно пуриновых) в реакциях замещения [10]. При выделении промежуточных олигомеров ионообменной хроматографией наблюдалась значительная их деградация, что приводило к существенным потерям целевого продукта [10]. В результате применения этого метода были получены лишь А- и Т-содержащие тиофосфатные аналоги, имеющие от двух до пяти нуклеотидных остатков [10, 13]. Кук для этих же целей применил 2',5'-дидезокси-5'-идотимидин [12], но использование плохо растворимой и обладающей низкой реакционной способностью бариевой соли тимидин-3'-тиофосфата и проведение реакции в пиридине, способном алкилироваться 5'-дезоксид-5'-иднуклеозидами [15], не позволили выявить перспективность этого подхода и развить его для получения более длинных, чем дитиотимидилат, тиофосфатных аналогов.

Ранее нами было предложено использовать для синтеза 5'-S-тиофосфатных аналогов 2',5'-дидезокси-5'-иднуклеозид-3'-О-(S-β-цианэтил)тиофосфаты (IIa–r), реагирующие с 2'-дезоксинуклеозид-3'-тиофосфатами (Ia–r) в DMF на два порядка быстрее соответствующих 5'-О-тозилных производных, и показано, что кинетика этой реакции подчиняется уравнению первого порядка [1]. В настоящей работе мы сообщаем о синтезе 5'-S-тиофосфатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов при помощи таких мономеров, а также о некоторых особенностях реакций замещения с участием производных тиофосфата, выявленных в процессе синтеза. Выбор объектов для синтеза, в частности соединений (VI) и (VII), был обусловлен, помимо прочих причин, наличием возможности сравнения их по биологической активности с природными прототипами, полученными нами при химико-ферментативном синтезе гена ангиотензина I [16].



(Ia-r)      (IIa-r)



а) B=Thy, б) B=4AnCyt,  
в) B=6BzAde, г) B=2IbuGua

T-(sT)<sub>8</sub> (IV)  
T-(sT)<sub>3</sub>-sG-sC-(sA)<sub>2</sub> (V)  
C-(sA)<sub>3</sub>-sT-(sG)<sub>2</sub>-(sA)<sub>3</sub> (VI)  
G-sG-sA-sT-(sG)<sub>2</sub>-sA-sT-sG-sT-(sA)<sub>2</sub> (VII)

Синтез нонатиотимидилата T-(sT)<sub>8</sub> (IV) \*

Номер стадии	Реагенты		DMF, мл (H <sub>2</sub> O, %)	Время реакции, ч
	P <sub>8</sub> -компонент, Li-соль, мкмоль	I-компонент, Li-соль, мкмоль		
1	(Ia), 20	(IIa), 22	0,4 (0)	1
2	Продукт стадии 1	(IIa), 22	0,4 (0)	2
3	» 2	(IIa), 22	0,4 (0)	3
4	» 3 **	(IIa), 12	0,4 (1)	8
5	» 4	(IIa), 12	0,4 (1)	12
6	» 5	(IIa), 12	0,6 (1)	16
7	» 6	(IIa), 12	0,8 (2)	20
8	» 7	(IIIa), 20	1,0 (2)	20

\* Выход нонатиотимидилата (IV) в пересчете на мономер (Ia) составил 36%.

\*\* Загружена половина продукта стадии 3, вторая половина использована на первой стадии синтеза октатионуклеотида (V).

Синтез аналогов (IV) — (VII) проводили ступенчатым методом в направлении 5' → 3'. Начальная стадия синтеза в каждом случае включала две основные операции: реакцию тиофосфатного компонента (Ia — г) и I-компонента (IIa — г) в DMF или в смеси его с водой и щелочную обработку продукта реакции для удаления β-цианэтильной защиты с тиофосфатной группы. Далее при наращивании цепи этот цикл повторяется с новым I-компонентом (IIa — г) (схема).

Таким образом, в качестве тиофосфатного компонента на первой стадии синтеза используются стартовые мономеры (Ia — г), а на последующих стадиях — образующиеся олигодезокситионуклеотиды с деблокированными 3'-тиофосфатными группами. В качестве I-компонента при наращивании олигонуклеотидной цепи применяются бифункциональные 2',5'-дидезокси-5'-иоднуклеозид-3'-O-(S-β-цианэтил)тиофосфаты (IIa — г). На последней стадии синтеза применяли терминирующие синтез 2',5'-дидезокси-5'-иоднуклеозиды (IIIa — г). Таким образом, всего для синтеза 5'-S-тиофосфатных аналогов олигонуклеотидов требуется набор 12 мономеров трех типов [4].

Для отработки условий синтеза 5'-S-тиофосфатных аналогов был принят синтез нонатиотимидилата (IV). На первой стадии синтеза реакция между литиевой солью тиофосфата (Ia) и 10% избытком литиевой соли иодпроизводного (IIa) в DMF проходит менее чем за 1 ч, давая с количественным выходом T-sTp<sub>8</sub>(CNEt) (табл. 1). Контроль за ходом реакции осуществляли при помощи иодометрического определения концентрации тиофосфата (Ia) [4], а также с помощью ТСХ в системе А и микроколоночной хроматографии на аминохроме. При выделении промежуточного дитиотимидилата, а также и других промежуточных олигомеров мы отказались от ионообменной хроматографии, применив осаждение продукта реакции ацетоном. Отказ от хроматографии, кроме естественного желания ускорить и упростить синтез, был обусловлен также стремлением избежать потерь продукта вследствие деградации его в процессе хроматографии [10] и свести к минимуму загрязнение его микропримесями, содержащимися в ионообменных смолах и снижающих реакционную способность тиофосфатных производных в изучаемой реакции нуклеофильного замещения [4]. Однозначность синтеза олиготионуклеотидов при этом гарантируется, во-первых, отсутствием побочных реакций, кроме медленной потери серы в тиофосфате (Ia) [13], и, во-вторых, надежным удалением I-мономеров (IIa — г), взятых в небольшом избытке. Основная часть их удаляется при осаждении реакционной смеси ацетоном, а следы производных (IIa — г) циклизуются впоследствии при щелочном удалении цианэтильной защитной группы, образуя нереакционноспособные 2',5'-дидезокси-5'-меркапто-нуклеозид-3',5'-циклотиофосфаты [13].

Соли всех применявшихся тиофосфатных производных были литиевые, так как в специальном эксперименте было установлено, что констан-

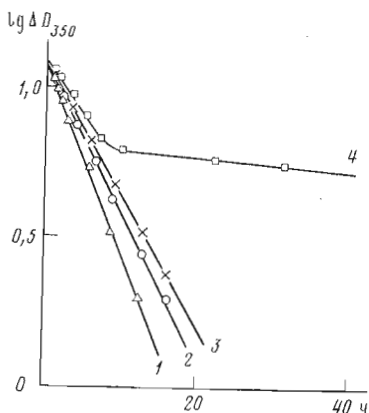


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость константы скорости и порядка реакции взаимодействия соединений (Ia) и (IIa) в 20% водном DMF при 22° С от природы их солей: 1 — Li-, 2 — Na-, 3 — K-, 4 —  $Bu_4N$ -соли. Концентрации соединений (Ia) и (IIa) соответственно 0,025 и 0,0275 М

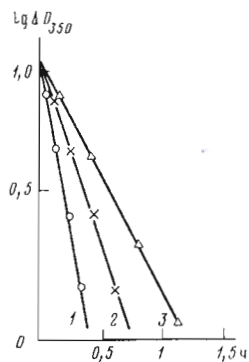


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость константы скорости реакции олиготимидилатов  $T-(sT)_n$  (Li-соль, 20 мкмоль) с соединением (IIa) (Li-соль, 22 мкмоль) в DMF (0,4 мл) при 22° С от длины тиофосфатного компонента и величины его отрицательного заряда: 1 —  $n=0$  (Ia), 2 —  $n=1$ , 3 —  $n=2$

та скорости реакции между, например, соединениями (Ia) и (IIa) в DMF или в смесях его с водой зависит от природы противокатионов в этих соединениях, причем катионы лития обеспечивают наибольшую скорость реакции (рис. 1). В случае  $Bu_4N^+$ -солей реагентов наряду с уменьшением константы скорости произошло и изменение порядка реакции, о чем свидетельствует нелинейность полулогарифмической анаморфозы кинетической кривой (рис. 1, график 4). Приведенные результаты говорят о присутствии в реакционной среде ионных ассоциатов, влияющих на реакционную способность реагентов. Наличие ионных ассоциатов в таком полярном растворителе, как DMF, трудно объяснить с позиций общепринятой теории электролитов [17], хотя в рамках новой теории, разрабатываемой Пальмом с сотр. [18], это вполне реально.

Наибольшую реакционную способность литиевых солей соединений (Ia — г) по сравнению с солями других металлов можно объяснить лучшей сольватированностью катионов лития апротонными диполярными растворителями, к которым относится DMF, или увеличением сродства к тиофосфат-аниону в ряду Li—Na—K. Это подтверждается также параллельным ухудшением растворимости солей соединения (Ia) в этом же ряду, причем этот эффект резко выражен. Склонность тиофосфатных производных к образованию комплексов отмечалась ранее [5, 19]. Аномальное поведение тетрабутиламмониевых солей можно связать, по-видимому, с их слабой склонностью к ионным взаимодействиям ввиду сильного экранирования заряда атома азота объемными алкильными радикалами.

В процессе синтеза нонатимидилата (IV) была обнаружена еще одна интересная закономерность. Сравнение констант скоростей реакций литиевой соли иодида (IIa) с олиготимидилатами различной длины показало, что реакционная способность последних падает с увеличением их длины и отрицательного заряда (рис. 2). Этот эффект вызван, вероятно, увеличением электростатического отталкивания при взаимодействии аниона соединения (IIa) с полианионами олиготимидилатов. Более подробное исследование этого явления затруднено параллельным ухудшением растворимости литиевых солей последних в DMF, вследствие чего на последующих стадиях синтеза приходится использовать более разбавленные растворы и добавлять воду. Добавки воды сильно снижают скорость реакции, что отмечалось ранее [13]. После проведения восьми стадий синтеза нонатимидилат (IV) был выделен ионообменной хромато-

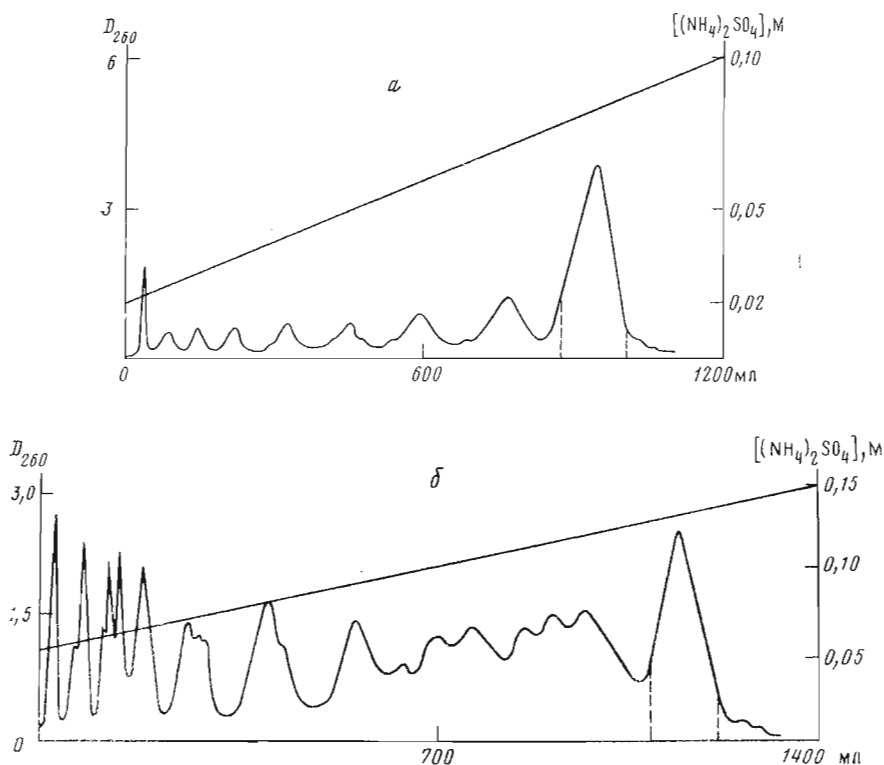


Рис. 3. Выделение 5'-S-тиофосфатных аналогов олигодезоксинуклеотидов ионообменной хроматографией на колонке (1,2×3,2 см) с аминохромом AC-300 ( $SO_4^{2-}$ ) в градиенте концентрации  $(NH_4)_2SO_4$  в 9 М мочеине (0,02 М  $KH_2PO_4$ , pH 7), скорость элюции 1 мл/мин: а — нонатимидилат (IV), выделено 316 ОЕ<sub>260</sub>; б — додекадеоксинуклеотид (VII), выделено 230 ОЕ<sub>260</sub>.

графией на аминохроме с последующей очисткой при помощи обращенно-фазовой и гель-хроматографии (рис. 3а, 4а). Выход соединения (IV) в расчете на исходный тиофосфат (Ia) составил 36%.

Синтез других тиофосфатных аналогов проводили аналогично, добавив на конечной стадии обработку аммиаком для удаления защитных групп с оснований. При синтезе соединения (V) в качестве тиофосфатного компонента на первой стадии синтеза использовали реакционный продукт третьей стадии синтеза соединения (IV). Аналоги (V) — (VII) выделяли как описано для соединения (IV) (например, рис. 3б, 4б). Выходы их в расчете на исходные мономеры составили соответственно 25,6; 20 и 12% от теоретического.

Индивидуальность синтезированных аналогов (IV) — (VII) была доказана при помощи микроколоночной хроматографии на аминохроме.

Результат анализа первичной структуры аналога (IV) приведен в работе [20]; он полностью подтверждает его строение. Анализ нуклеотидной последовательности синтезированных аналогов (V) — (VII) был проведен модифицированным методом [21]. Были подобраны условия фосфорилирования тиофосфатных аналогов Т4-полинуклеотидкиназой и условия расщепления неприродных межнуклеотидных связей фосфодиэстеразой змеиного яда, основываясь на наших предыдущих результатах [14]. Трудности встретились при разделении продуктов фосфодиэстеразного гидролиза на стадии гомохроматографии, где наблюдалась значительная деградация олигодезокситионуклеотидов при повышенной температуре, вероятно, вследствие окисления. Добавка меркаптоэтанолла и понижение температуры позволили свести этот процесс к минимуму. Нуклеотидные карты синтезированных аналогов (V) — (VII) полностью подтверждают их структуру (рис. 5а — в). Биологическая активность синтезированных аналогов в настоящее время исследуется. Предварительные результаты

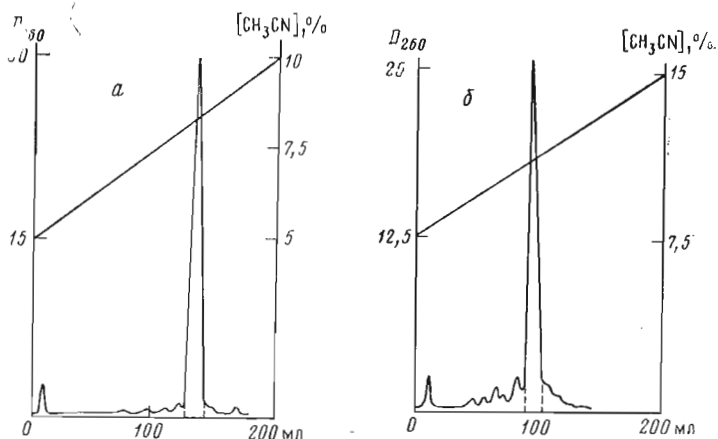


Рис. 4. Выделение 5'-S-тиофосфатных аналогов олигодезоксинуклеотидов обращенно-фазовой хроматографией на колонке (0,9×12 см) с  $\text{Me}_3\text{Si}$ -силикагелем (300 м<sup>2</sup>, размер частиц — 20 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,05 М ацетате аммония, pH 6,0 (200 мг), скорость элюции 1,1 мл/мин: а — нонатимидилат (IV), 5–10%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , выделено 282  $\text{OE}_{260}$ ; б — додекадесокситионуклеотид (VII), 7,5–15%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , выделено 173  $\text{OE}_{260}$

показывают, что нонатимидилат (IV) и октатионуклеотид (V) инициируют считывание глобиновой мРНК кролика РНК-зависимой ДНК-полимеразой из *E. coli*, дека- и додекатионуклеотиды (VI) и (VII) сшиваются Т4-ДНК-лигазой на природной «кислородной» матрице как друг с другом, так и с «кислородными» олигодезоксирибонуклеотидами [14]. Последние результаты особенно важны, так как позволяют встроить 5'-S-тиофосфатные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов в кодирующую цепь синтетического гена гормона ангиотензина I, показавшего экспрессию в *E. coli* [15], и провести исследование их биологической активности не только *in vitro*, но и *in vivo*.

Таким образом, разработанный метод синтеза 5'-S-тиофосфатных аналогов олигодезоксинуклеотидов позволяет приблизить их по доступности к обычным продуктам олигонуклеотидного синтеза, что открывает широкие перспективы для развертывания исследований в этой области.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 2'-дезоксинуклеозиды (Merck, ФРГ),  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (Amersham, Англия), фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.1.4.1, Worthington), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.778) [20], сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция), смолу Chelex-100 (Bio-Rad, США), аминокром и триметилсилилированный силикагель отечественного производства. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — 1 М ацетат аммония (pH 6,5), 10 : 10 : 2 (А). Продукты на хроматограммах обнаруживали в УФ-свете («Хроматоскоп») и реактивом Динше, производные со свободной 3'-тиофосфатной группой — парами йода. Спектры записывали на регистрирующем спектрофотометре Spcord UV VIS (ГДР). Растворители готовили по [22]. Вещества высушивали 30 мин в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

*Синтез 5'-S-тиофосфатных аналогов олигодезоксинуклеотидов.* Мономеры синтезировали по методу [1], там же описано йодометрическое определение концентрации тиофосфатных производных и методика кинетических измерений. Условия межнуклеотидных реакций нуклеофильного замещения для первой стадии приведены ниже, а последующих — представлены в табл. 1–4. Условия выделения соединений (V) и (VI) приведены ниже, а соединений (IV) и (VII) — на рис. 3 и 4. Нуклеотидные карты синтезированных аналогов представлены на рис. 5 и в работе [20].

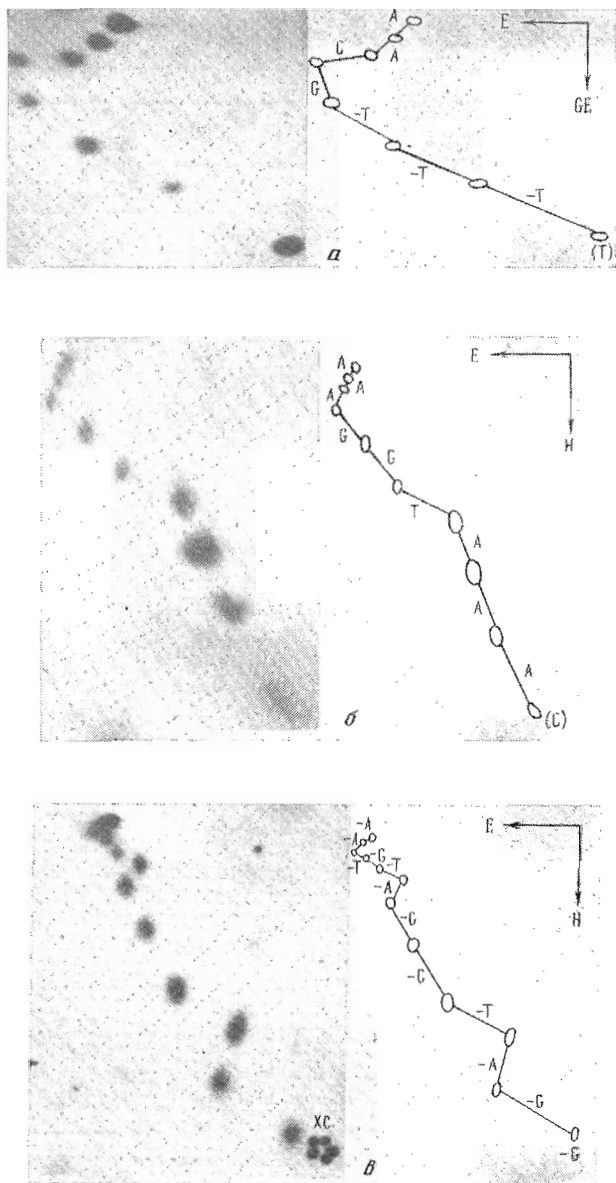


Рис. 5. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилированных олигодезоксинуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда; направление E — электрофорез на ацетилцеллюлозе в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5) при 90 В/см, направление H — гомохроматография в гомосмеси V [23], направление GE — гель-электрофорез в условиях, приведенных в работе [24], ХС — краситель ксиленцианол: а — октадезоксионуклеотид (V), б — декадезоксионуклеотид (VI), в — додекадезоксионуклеотид (VII)

*Межнуклеотидная реакция нуклеофильного замещения (первая стадия, типовая методика).* Смесь р<sub>s</sub>-компонента (I) и I-компонента (II) перемешивали 1 ч на магнитной мешалке в DMF (0,4 мл), отбирая аликвогты по 2 мкл для кинетических измерений. К реакционной смеси добавляли ацетон (2 мл), осадок отфильтровывали, промывали ацетоном (3 × 2 мл) и высушивали.

*Удаление цианэтильной защитной группы.* Продукт межнуклеотидной реакции замещения (10 мкмоль по исходному мономеру) растворяли в 0,5 н. LiOH (1 мл) и выдерживали 1 ч при ~20°С, добавляли дауэкс 50 (H<sup>+</sup>) до рН 6,5–7,0 по универсальному индикатору, катионит отфильтро-

Синтез октадезокситионуклеотида T-(sT)<sub>3</sub>-sG-sC-(sA)<sub>2</sub> (V) \*

Номер стадии	Реагент		DMF, мл (H <sub>2</sub> O, %)	Время реакции, ч
	p <sub>s</sub> -компонент, Li-соль, мкмоль	I-компонент, Li-соль, мкмоль		
1	Продукт стадии 3 в синтезе олигонуклеотида (IV)	(IIг), 12	0,4 (1)	16
2	» 1	(IIб), 12	0,6 (1)	12
3	» 2	(IIв), 13	0,8 (2)	20
4	» 3	(IIIв), 20	1,0 (2)	20

\* Выход октатионуклеотида (V) в пересчете на исходный мономер (Iа) составил 25,6%.

Таблица 3

Синтез декадезокситионуклеотида C-(sA)<sub>3</sub>-sT-(sG)<sub>2</sub>-(sA)<sub>3</sub> (VI) \*

Номер стадии	Реагент		DMF, мл (H <sub>2</sub> O, %)	Время реакции, ч
	p <sub>s</sub> -компонент, Li-соль, мкмоль	I-компонент, Li-соль, мкмоль		
1	(Iб), 10	(IIв), 11	0,2 (0)	6
2	Продукт стадии 1	(IIв), 11	0,2 (0)	10
3	» 2	(IIв), 12	0,4 (0)	16
4	» 3	(IIа), 12	0,4 (0)	4
5	» 4	(IIг), 12	0,6 (1)	20
6	» 5	(IIг), 12	0,8 (1)	30
7	» 6	(IIв), 13	0,8 (2)	34
8	» 7	(IIв), 13	1,0 (2)	34
9	» 8	(IIIв), 20	1,0 (2)	24

\* Выход декатионуклеотида (VI) в пересчете на исходный мономер (Iб) составил 20%.

Таблица 4

Синтез додекадезокситионуклеотида G-sG-sA-sT(sG)<sub>2</sub>-sA-sT-sG-sT-(sA)<sub>2</sub> (VII) \*

Номер стадии	Реагент		DMF, мл (H <sub>2</sub> O, %)	Время реакции, ч
	p <sub>s</sub> -компонент, Li-соль, мкмоль	I-компонент, Li-соль, мкмоль		
1	(Iг), 10	(IIг), 11	0,2 (0)	7
2	Продукт стадии 1	(IIв), 11	0,2 (0)	12
3	» 2	(IIа), 11	0,4 (0)	4
4	» 3	(IIг), 12	0,4 (0)	16
5	» 4	(IIг), 12	0,6 (1)	24
6	» 5	(IIв), 12	0,8 (1)	24
7	» 6	(IIа), 13	0,8 (2)	16
8	» 7	(IIг), 13	1,0 (2)	34
9	» 8	(IIа), 13	1,2 (2)	20
10	» 9	(IIв), 13	1,5 (2)	40
11	» 10	(IIIв), 20	1,5 (2)	30

\* Выход додекатиионуклеотида (VII) в пересчете на мономер (Iг) составил 12%.

вывали, промывали водой и фильтрат упаривали досуха в вакууме. Осадок использовали в качестве p<sub>s</sub>-компонента при проведении следующей реакции замещения.

*Снятие защитных групп с оснований.* Продукт межнуклеотидной реакции замещения на последней стадии синтеза (10 мкмоль) после осажде-



ния ацетоном растворяли в конц. растворе аммиака (5 мл) и выдерживали 4 сут в темноте при  $\sim 20^\circ\text{C}$ . Затем раствор упаривали в вакууме и остаток использовали далее для хроматографической очистки.

*Выделение соединений (IV)–(VII).* Условия хроматографического выделения соединений (IV) и (VII) приведены на рис. 3 и 4. Соединения (V) и (VI) выделяли аналогично, используя такую же колонку и сорбент. В случае соединения (V) применяли для элюции линейный градиент  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,02–0,1 М, 1200 мл) и получали 230  $\text{OE}_{260}$  продукта, а элюцию соединения (VI) проводили градиентом  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,04–0,1 М, 1400 мл), получив 324  $\text{OE}_{260}$  необходимого производного. После ионообменной хроматографии на аминокроме фракции, соответствующие пику продукта, объединяли и наносили на колонку для обращенно-фазовой хроматографии. Условия хроматографии соединений (V) и (VI) аналогичны условиям выделения соединений (IV) и (VII), приведенных на рис. 4. Элюцию соединения (V) проводили линейным градиентом  $\text{CH}_3\text{CN}$  (5–10%, 200 мл) и получили 215  $\text{OE}_{260}$  октауклеотида, а соединения (VI) – градиентом  $\text{CH}_3\text{CN}$  (6–12%, 200 мл) и получили 255  $\text{OE}_{260}$  продукта. Фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали в вакууме и обессоливали на колонке с сефадексом G-25 ( $1,7 \times 25$  см), элюируя вещество водой со скоростью 2,5 мл/ч. Продукт собирали, упаривали в вакууме и раствор в воде пропускали через колонку с 2 мл катионита Chelex-100 ( $\text{Na}^+$ ). Вещество элюировали водой, элюат упаривали досуха. Продукты хранили при  $-20^\circ\text{C}$ .

*Анализ соединений (IV)–(VII) микроколоночной хроматографией* проводили на колонке ( $0,12 \times 5$  см) с аминокромом AC-300 ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) в градиенте концентрации  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в 9 М мочеvine (0,02 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0), скорость элюции 2 мл/ч. Для соединений (IV) и (V) использовали градиент  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0–0,15 М), для соединений (VI) и (VII) – 0–0,2 М. Все исследуемые соединения были гомогенны.

*Кинетика взаимодействия различных солей соединений (Ia) и (IIa) в 20% водном DMF при  $22^\circ\text{C}$ .* Нужную соль соединений (Ia) и (IIa) получали пропусканьем водных растворов их литиевых солей (0,01 ммоль) через колонку с дауэксом 50 в соответствующей форме (1 мл), элюировали продукт водой, элюат упаривали досуха в вакууме и растворы в 20% водном DMF (0,1 мл) использовали для реакции, смешивая равные объемы. Кинетические измерения проводили по методу, описанному в работе [1]. Результаты представлены на рис. 1.

*Установление нуклеотидной последовательности в аналогах (IV)–(VII).* Результат анализа нонатриотимидилата (IV) приведен в работе [20]. Первичная структура соединений (V)–(VII) была подтверждена с помощью модифицированного метода [21]. Фосфорилирование олигонуклеотидов полинуклеотидкиназой фага T4 выполняли в стандартном буферном растворе [20] в течение 1 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Реакционная смесь (0,01 мл) содержала  $0,2 \cdot 10^{-9}$  М олигонуклеотид,  $0,6 \cdot 10^{-9}$  М АТФ, 2 мкКи  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$  и 2 ед. акт. фермента. Фосфорилированный продукт, практически гомогенный, очищали от избытка АТФ электрофорезом в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочеvinу ( $20 \times 20 \times 0,04$  см, напряжение 900 В, пробег маркера бромфенолового голубого 15 см). Полоосу, содержащую продукт, вырезали, добавляли воду (30 мкл) и выдерживали 10 ч при  $5^\circ\text{C}$ . Элюат (12 мкл) гидролизовали 5 мкл фосфодиэстеразы змеиного яда (концентрация 0,075 мг/мл) при  $20^\circ\text{C}$  с отбором аликвот (2 мкл) через 0,3; 0,6; 1,0; 3; 6; 9; 15 и 30 мин. Аликвоты сразу же переносили в пробирку с 3 мкл 0,1 М EDTA. Двумерное разделение продуктов гидролиза проводили по методу [21], используя гомосмесь V [23], содержащую 0,05 М меркаптоэтанол, при  $37^\circ\text{C}$ .

Авторы выражают искреннюю признательность Д. К. Беляеву за помощь в работе и обсуждение результатов и В. В. Гулевичу за предоставление сорбента для обращенно-фазовой хроматографии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1516–1524.
2. Шомигейн Р. С., Гиллер С. Н. Успехи химии гетероциклов. Рига: Зинатне, 1976, с. 307–322.
3. Zamesnik P. C., Stefenson M. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 1, p. 280–284.
4. Eckstein F. Angew. Chem. Int. Edn., 1975, v. 14, № 3, p. 160–166.
5. Eckstein F. Acc. Chem. Res., 1979, v. 12, № 1, p. 204–210.
6. Eckstein F., Gindl H. Eur. J. Biochem., 1970, v. 13, № 2, p. 558–564.
7. de Clercq E., Eckstein F., Merigan T. C. Science, 1969, v. 165, № 3898, p. 1137–1139.
8. Michelson A. M. J. Chem. Soc., 1962, № 3, p. 979–982.
9. Stuetz A., Scheit K. H. Eur. J. Biochem., 1975, v. 50, № 2, p. 343–349.
10. Kress J., Nagpal K. L., Nagyvary J., Uchic J. T. Nucl. Acids Res., 1975, v. 2, № 1, p. 1–9.
11. Nagyvary J., Chladek S., Roe J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1970, v. 39, № 5, p. 878–882.
12. Cook A. F. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 1, p. 190–195.
13. Chladek S., Nagyvary J. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 6, p. 2079–2085.
14. Рыбаков В. Н., Ривкин М. И., Богачев В. С., Кумарев В. П. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1423–1425.
15. Verheyden J. P. H., Moffat J. G. J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 7, p. 2319–2326.
16. Kumarev V. P., Rivkin M. I., Bogachev V. S., Baranova L. V., Merkulov V. M., Rybakov V. N. FEBS Letters, 1980, v. 114, № 2, p. 273–277.
17. Гаммер Л. П. Основы физической органической химии. М.: Мир, 1972.
18. Пальм В. А. Основы количественной теории органических реакций. Л.: Химия, 1977, с. 90–106.
19. Neumann H., Steinberg J., Katchalski E. J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 17, p. 3841–3848.
20. Rybakov V. N., Rivkin M. I., Kumarev V. P. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 1, p. 189–201.
21. Tu C. P. D., Jay E., Bahl C. P., Wu R. Analyt. Biochem., 1976, v. 74, № 1, p. 73–93.
22. Общий практикум по органической химии. М.: Мир, 1965, с. 605–629.
23. Jay E., Vambara R., Padmanabhan R., Wu R. Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, № 2, p. 331–353.
24. Коробко В. Г., Грачев С. А., Петров Н. А. Биорган. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1423–1425.

Поступила в редакцию  
1.III.1982  
После доработки  
5.V.1982

### PHOSPHOROTHIOATE ANALOGS OF NUCLEIC ACIDS. II. THE SYNTHESIS AND PROPERTIES OF 5'-S-PHOSPHOROTHIOATE ANALOGS OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDES

KUMAREV V. P., BOGACHEV V. S., KOBSEV V. F.,  
BARANOVA L. V., RIVKIN M. I., RYBAKOV V. N.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy  
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A general method for the synthesis of 5'-S-phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides is proposed. It is based on the reaction between phosphorothioate ( $p_s$ ) component, i. g. deoxynucleoside 3'-phosphorothioates, and alkylating component, 2',5'-dideoxy-5'-iodonucleoside-3'-S- $\beta$ -cyanoethylphosphorothioates or 2',5'-dideoxy-5'-iodonucleosides in DMFA and DMFA – water mixture. The first-order rate constants of this reaction have been studied as a function of counter-cations and length of the  $p_s$ -component. They were shown to decrease in the series  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Bu}_4\text{N}^+$  and  $\text{Tr}_s > (\text{Tr}_s)_2 > (\text{Tr}_s)_3$ . The efficiency of the method was illustrated by the synthesis of various defined sequences related to the globin mRNA and synthetic angiotensin I gene in good yields. Modification of usual sequence analysis method for synthesized analogs was developed.