



УДК 577.113.4/5

ТИОФОСФАТНЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

V*. СИНТЕЗ 5'-ФОСФОТИОЭФИРНЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ ПРИ ПОМОЩИ ЦВИТТЕР-ИОННЫХ МОНОМЕРОВ

*Богачев В. С., Кумарев В. П., Рыбаков В. Н.**Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Разработан модифицированный метод синтеза 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов, основанный на реакции алкилирования Bu_4N^+ -солей дезоксирибонуклеозид-3'-О-тиофосфатов новыми цвиттер-ионными мономерами — 2',5'-дидезокси-5'-иоднуклеозид-3'-О-{S- β -[N-(*n*-диэтилметиламино)фенил]карбамоилэтил} тиофосфатами в DMF. Показано, что применение таких мономеров и солей P_s -производных приводит к увеличению скорости реакции алкилирования в среднем, в расчете на одну стадию синтеза, более чем в 100 раз по сравнению с использованным ранее методом и достигению ее независимости от длины и заряда P_s -компонента. Данным методом синтезированы 5'-фосфотиоэфирные аналоги гексамидилата и гексадекадесоксирибонуклеотида CCATCCTTCCATTTG с выходом соответственно 51,6 и 12% в расчете на исходные мономеры. Структура последнего аналога соответствует одному из фрагментов синтетического гена гормона человека ангиотензина I. Она подтверждена модифицированным методом нуклеотидных карт.

5'-Фосфотиоэфирные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие неприродные P-S-C(5')-межнуклеотидные связи [2–5], обладают специфическими физико-химическими и биохимическими свойствами [5]. Они являются субстратами ряда важных ферментов метаболизма ДНК, таких, как ДНК-полимераза 1 *E. coli* [6], полинуклеотидлигаза и полинуклеотидкиназа фага T4 [7], различных нуклеаз [8]. Низкие скорости соответствующих ферментативных реакций в сочетании с небольшими, по существенным отличиям таких соединений от прототипов с природным типом межнуклеотидных связей делает их весьма удобными инструментами исследования перечисленных и других ферментов. Такие производные ДНК могут оказаться полезными в различных структурных исследованиях нуклеиновых кислот. Дальнейший прогресс в данной области связан с расширением исследований субстратных и физико-химических свойств рассматриваемых аналогов с целью выявления перспектив их практического применения. Одним из аспектов этой проблемы является повышение синтетической доступности таких соединений.

Ранее нами был разработан общий метод синтеза 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов, в основе которого лежит реакция алкилирования дезоксирибонуклеозид-3'-О-тиофосфатов особыми мономерами — 2',5'-дидезокси-5'-иоднуклеозид-3'-О-(S- β -цианэтил)тиофосфатами в DMF [5]. Но в процессе применения данного метода были выявлены недостатки, ограничивающие сферу его использования синтезом сравнительно коротких аналогов олигонуклеотидов. Так, увеличение длины P_s -компонента и величины его отрицательного заряда сопровождалось значительным уменьшением скорости его взаимодействия с анионами указанных мономеров. Например, при синтезе 5'-фосфотиоэфирного аналога нонатимидилата длительность реакции алкилирования на первой стадии составляла 1 ч, а на восьмой — 20 ч [5]. Было высказано предположение, что одной из причин этого является возрастание сил электростатического отталки-

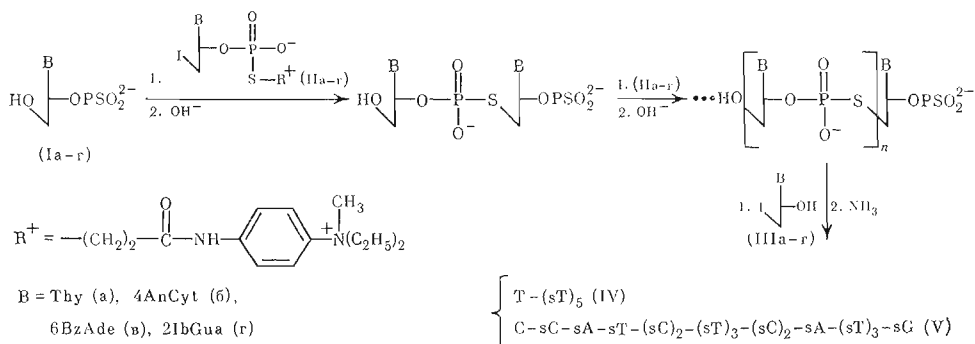
* Сообщение IV см. [1]. Префикс «d» в сокращенном написании дезоксирибонуклеозидов для краткости всюду опущен. Используются следующие сокращения: sN — 2',5'-дидезокси-5'-меркаптонуклеозид, P_s — тиофосфат, Bu — *n*-бутил, DMF — N,N-диметилформамид.

вания анионов реагирующих частиц по мере увеличения длины P_S -компонента [5]. Использование противокатионов небольшого размера, например катионов лития, образующих с анионами мономеров нейтральные ассоциаты [9], частично компенсирует этот эффект [5], но протекающая параллельно ассоциация катионов лития с анионами P_S -компонента значительно снижает реакционную способность последних в реакции алкилирования [9]. Недостатком Li^+ -солей P_S -компонента является также плохая их растворимость в DMF, резко ухудшающаяся при увеличении его длины [5]. Такие соли выпадают в осадок, и реакцию алкилирования приходится значительную часть времени проводить в гетерофазном режиме, что также отрицательно сказывается на ее скорости. Замена Li^+ -солей реагентов на их Bu_4N^+ -соли или добавление воды в реакционную смесь улучшает растворимость P_S -компонента в DMF, но при этом наблюдается уменьшение скорости реакции алкилирования [5, 9].

Недавно нами был предложен способ увеличения скорости реакции алкилирования: варьирование заряда иодмономеров и типа соли P_S -компонента [1, 9], разработан метод синтеза цвиттер-ионных мономеров для синтеза 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигодезоксинуклеотидов и изучены их реакции с производными тиофосфата в DMF [1]. Было установлено, что реакционная способность таких мономеров в реакциях алкилирования значительно выше, чем у известных отрицательно заряженных прототипов. В настоящей работе мы сообщаем о синтезе 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов при помощи новых цвиттер-ионных мономеров — 2',5'-дидезокси-5'-иоднуклеозид-3'-O-{S - β -[N-(n - диэтилметил-амино)фенил]карбамоилэтил} тиофосфатов (IIa—r) [1].

Синтез целевых аналогов (IV) и (V) осуществляли по традиционной схеме [5], проводя ступенчатое наращивание цепи с 3'-конца мономерами (IIa—r) (схема 1):

Схема 1



Начальная стадия синтеза в каждом случае включала две основные операции: реакцию P_S -компонента — дезоксинуклеозид-3'-O-тиофосфатов (Ia—r) [10] с I-компонентом — мономером (IIa—r) в DMF и щелочную обработку продукта реакции для удаления защитной группировки с его 3'- P_S -группы. Далее этот цикл повторялся с новым мономером (IIa—r). Для получения 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигонуклеотидов с концевой 3'-ОН-группой, что требуется для исследования их биохимических свойств, в качестве I-компонента на конечной стадии использовали 2',5'-дидезокси-5'-иоднуклеозиды (IIIa—r) [10], а вместо обработки продукта реакции щелочью его деблокировали аммиаком.

Ранее нами был апробирован вариант синтеза 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигонуклеотидов без хроматографической очистки продуктов реакции алкилирования на промежуточных стадиях [5]. Правильность структуры конечного продукта при этом гарантируется надежным удалением избыточного I-компонента, часть которого остается в растворе при осаждении продукта реакции ацетоном, а оставшееся количество после деблокирования P_S -группы в щелочи циклизуется с образованием перек-

Синтез гексатимидилата T-(sT)₅ (IV) *

Номер стадии	Реагенты	
	P _S -компонент (Bu ₄ N ⁺ -соль) (мкмоль)	I-компонент (мкмоль)
1	Соединение (Ia) (23,4)	Мономер (IIa) (23,4)
2	Продукт стадии 1 (22,2)	» (22,2)
3	» 2 (21,1)	» (21,1)
4	» 3 (19,0)	» (19,0)
5	» 4 (16,9)	» (IIIa) (36,0)

* Выход аналога (IV) в пересчете на исходный тиофосфат (Ia) составил 51,6%. Объем DMF везде составлял 0,2 мл, время реакции 3 мин.

Таблица 2

Синтез гексадекаатионуклеотида C-sC-sA-sT-(sC)₂-(sT)₃-(sC)₂-sA-(sT)₃-sG (V) *

Номер стадии	Реагенты	
	P _S -компонент (Bu ₄ N ⁺ -соль) (мкмоль)	I-компонент (мкмоль)
1	Тиофосфат (Iб) (20)	Мономер (IIб) (24)
2	Продукт стадии 1	» (IIв) (28)
3	» 2	» (IIa) (24)
4	» 3	» (IIб) (25)
5	» 4	» (IIб) (24)
6	» 5	» (IIa) (24)
7	» 6	» (IIa) (26)
8	» 7	» (IIa) (26)
9	» 8	» (IIб) (26)
10	» 9	» (IIб) (26)
11	» 10	» (IIв) (30)
12	» 11	» (IIa) (26)
13	» 12	» (IIa) (27)
14	» 13	» (IIa) (28)
15	» 14	» (IIIг) (40)

* Выход гексадекаатионуклеотида (V) в пересчете на исходный тиофосфат (Iб) составил 12%. Объем DMF везде составлял 0,6 мл, время реакции в случае мономеров (IIa—б) — 2 мин, (IIв—г) и (IIIг) — 8 мин.

ционноспособных 2',5'-дидезокси-5'-меркаптонуклеозид-3',5'-циклотиофосфатов [2, 5]. P_S-компоненты вводили в реакцию алкилирования в виде Bu₄N⁺-солей, так как такие соли обладают наивысшей реакционной способностью при взаимодействии с электронейтральными мономерами в DMF [1, 9], прекрасно растворяясь в последнем без добавок воды.

Для отработки условий синтеза мы предприняли модельный синтез 5'-фосфотиоэфирного аналога гексатимидилата (IV). Реакцию алкилирования проводили в безводном DMF, используя эквивалентные соотношения реагентов (табл. 1). Контроль за ходом реакции осуществляли методом отбора проб, определяя концентрацию P_S-компонента в них иодометрическим методом [9, 10], а также при помощи микроколонной хроматографии. Ввиду очень высокой скорости реакции фиксировали только момент ее окончания. На всех стадиях синтеза аналога (IV) для этого требовалось не более 3 мин. Продукт реакции осаждали смесью ацетон — эфир, 1 : 1, так как осаждения его ацетоном, как в случае Li⁺-солей P_S-компонентов [5], не происходило. Но и при обработке указанной смесью растворителей Bu₄N⁺-соль продукта осаждалась в виде масла. Растворители с него декантировали, масло сушили и обрабатывали 30 мин 1 М LiOH для деблокирования P_S-группы. После перевода продукта в Bu₄N⁺-соль при помощи ионообменной хроматографии его использовали в качестве P_S-компонента на следующей стадии синтеза. После проведения пяти стадий синтеза

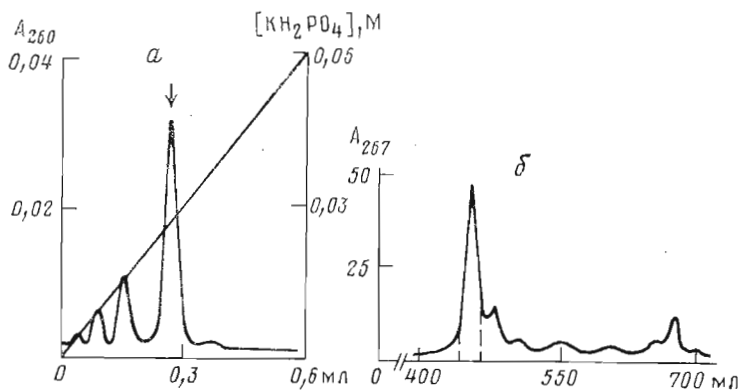


Рис. 1. Выделение и анализ аналога (IV): *a* — анализ реакционной смеси на конечной стадии синтеза методом микроколоночной хроматографии на колонке (0,12×5 см) с аминохромом АС-80 (HPO_4^{2-}) в градиенте концентрации калий-фосфатного буфера (рН 7) в 9 М мочеvine. Стрелкой отмечено место выхода контрольного образца Т-(sT)₅; *б* — выделение аналога (IV) гель-хроматографией на колонке (4,5×63 см) с сефадексом G-25 (superfine) в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере (рН 7,5), скорость элюции 40 мл/ч, 5° С, выделено 696 ОЕ₂₆₇

аналог (IV) был выделен гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-25 (рис. 1). Его выход в расчете на исходный тиофосфат (Ia) составил 51,6%, или ~88% на стадию. По данным микроколоночной хроматографии и УФ-спектроскопии, синтезированный продукт был идентичен контрольному образцу Т-(sT)₅, синтезированному нами известным методом [5]. Осуществление синтеза соединения (IV) показало, что при использовании нового мономера (IIa) скорость реакции алкилирования на всех стадиях синтеза оставалась постоянной и не зависела от длины P_S-компонента.

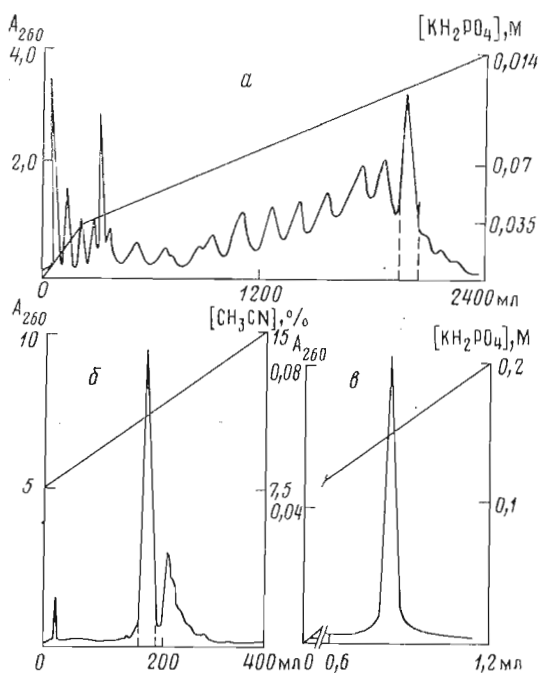


Рис. 2. Выделение аналога (V). *a* — ионообменная хроматография половины реакционной смеси на колонке (1,5×42 см) с аминохромом АС-80 (HPO_4^{2-}) в градиенте концентрации калий-фосфатного буфера (рН 7) в 9 М мочеvine, скорость элюции 90 мл/ч, выделено 242 ОЕ₂₆₀; *б* — обращенно-фазовая хроматография на колонке (1,1×18 см) с $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ -силикагелем в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,05 М аммоний-ацетатном буфере (рН 6), скорость элюции 130 мл/ч, выделено 182 ОЕ₂₆₀; *в* — анализ аналога (V) микроколоночной хроматографией в условиях, указанных на рис. 1а

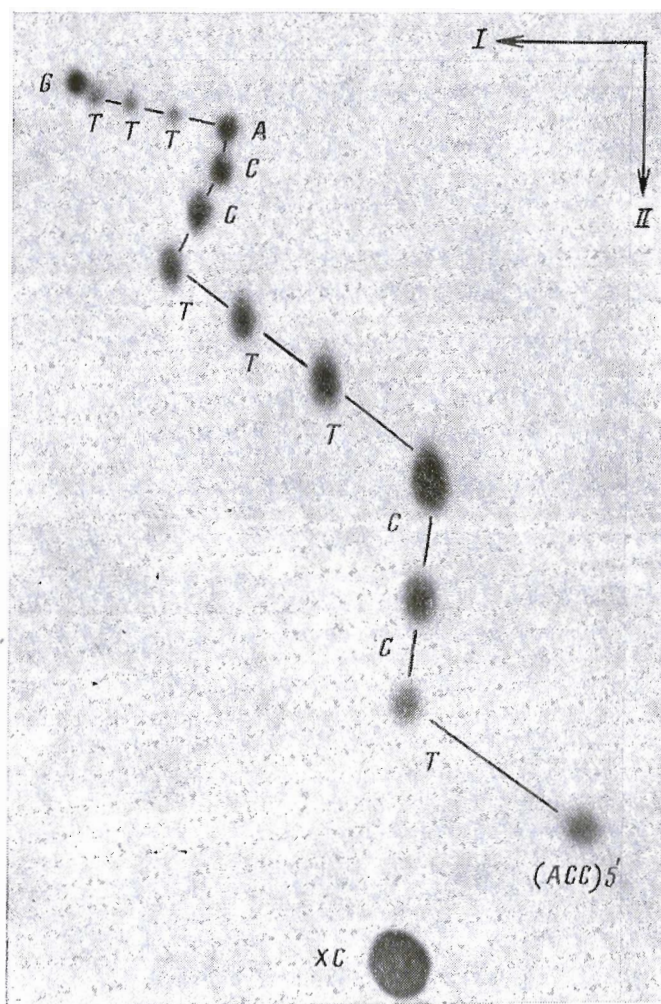


Рис. 3. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза 5'-³²P-фосфорилированного аналога (V) фосфодиэстеразой змеиного яда. Направление I — электрофорез на ацетицеллюлозе в пиридиний-ацетатном буфере (рН 3,5) при 90 В/см, направление II — гомохроматография в гомосмеси II [12], XC — краситель ксиленцианол

Растворимость Bu_4N^+ -солей P_S -компонентов в DMF также была практически постоянной и не зависела от их длины. Были выявлены и недостатки нового подхода. Так, наблюдались потери продукта при осаждении его из реакционной смеси вследствие неполной коагуляции выпадающего масла. Дополнительные эксперименты показали, что осаждение продукта лучше проводить в виде Li^+ -соли, добавляя к реакционной смеси 0,05 M раствор иодистого лития в ацетоне. Образующийся при этом осадок легко отделялся фильтрованием.

Синтез 5'-фосфотиозефирного аналога (V) проводили аналогично (табл. 2), добавляя на конечной стадии обработке реакционного продукта аммиаком для удаления защитных групп с оснований. Для более полного протекания реакции алкилирования применяли 1,2–1,5-кратный избыток I-компонента. Как и при проведении модельного синтеза аналога (IV), скорость реакции алкилирования и растворимость Bu_4N^+ -солей P_S -компонента оставались постоянными на всех стадиях синтеза. Средние затраты времени на проведение одной стадии синтеза составили 1,3 ч, при этом основную их часть составляли затраты времени на деблокирование P_S -групп (0,5 ч) и высушивание P_S -компонента (0,3 ч). После проведения 15 стадий синтеза соединение (V) выделяли монообменной хроматографи-

ей на колонке с аминохромом AC-80 с последующей очисткой при помощи обращенно-фазовой и гель-хроматографии (рис. 2). Выход аналога (V) составил 12% в пересчете на исходный тиофосфат (Iб), или 85% в расчете на стадию. УФ-спектр аналога (V) характерен для пиримидиновых олигонуклеотидов ($\lambda_{\text{макс}}$ 265 нм). Анализ нуклеотидной последовательности соединения (V) проводили модифицированным методом Сэнгера [11], используя измененные условия ферментативного 5'-фосфорилирования и гидролиза фосфотиоэфирных связей, а также гомохроматографии [5]. Нуклеотидная карта аналога (V) полностью подтверждает его структуру (рис. 3). Исследование биохимических свойств синтезированного аналога (V) показало, что он проявляет матричные свойства в процессе его репарационной репликации ДНК-полимеразой 1 *E. coli* в присутствии содержащей природные связи олигонуклеотидной затравки [6]. Репликация проходила правильно, но не до конца и с меньшей скоростью по сравнению с природным прототипом [6]. Получены также предварительные данные по шивке аналога (V) на комплементарной, содержащей природные связи матрице как с модифицированными, так и с содержащими природные связи олигодезокси-нуклеотидами при помощи полинуклеотидлигазы фага T4. Скорость этой реакции была также ниже, чем при шивке прототипа с природным типом межнуклеотидных связей.

Таким образом, предлагаемая модификация метода синтеза 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов позволяет существенно повысить его эффективность. Так, скорость реакции алкилирования увеличена в среднем, в расчете на одну стадию, более чем в 100 раз по сравнению с наиболее эффективным известным методом [5], затраты времени на проведение одной стадии синтеза сокращены в 10 раз, достигнута независимость скорости реакции алкилирования от длины и заряда P_S -компонента. Последнее обстоятельство в сочетании с хорошей и не зависящей от длины P_S -компонента растворимостью его Bu_4N^+ -соли в DMF позволяет существенно увеличить длину синтезируемого продукта, что важно для исследования биохимических свойств рассматриваемых аналогов, особенно их матричных свойств.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезокси-нуклеозиды (Merck, ФРГ), сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция), дауэкс 50W×2(H⁺) (Dow-Chemical, США), Chelex-100 (Bio-Rad, США), аминохром AC-80 (НИС НГУ) и триметилсилилированный силикагель (предоставлен В. В. Гулевичем, ИЦиГ, СО АН СССР). УФ-спектры записывали на регистрирующем спектрофотометре Spesord (ГДР). Соединения (Iа, б) и (IIIа, г) синтезировали методами, описанными в работе [5], мономеры (IIа—г) — методом, приведенным в работе [1]. Растворители готовили по прописям [13]. Вещества высушивали 15 мин в вакууме над P₂O₅ при 20° С.

Синтез 5'-фосфотиоэфирных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов. Условия межнуклеотидных реакций алкилирования для первых стадий синтеза и удаления защитных групп с P_S -групп приведены ниже, а последующих представлены в табл. 1 и 2. Условия выделения аналогов (IV) и (V) приведены на рис. 1 и 2, нуклеотидная карта аналога (V) — на рис. 3.

Межнуклеотидная реакция алкилирования при синтезе аналога (IV) (первая стадия). К раствору P_S -компонента ((Bu_4N^+)₂-соль тиофосфата (Iа), 23,4 мкмоль) в 0,2 мл DMF прибавляли I-компонент (мономер (IIа), 23,4 мкмоль), перемешивали, выдерживали 3 мин, отбирая пробы объемом 1,5 мл для подометрического определения концентрации P_S -компонента [10]. К реакционной смеси добавляли смесь ацетон — эфир, 1 : 1 (2 мл), образовавшуюся эмульсию сильно встряхивали, охлаждали до 0° С. Растворители деаэтировали, масло высушивали.

Удаление защитной группы с P_S -группировки при синтезе аналога (IV). Продукт межнуклеотидной реакции алкилирования (23,4 мкмоль по исходному тиофосфату (Iа)) растворяли в 1 мл 1 М LiOH, выдерживали 0,5 ч при 20° С, добавляли дауэкс 50 (H⁺) порциями, при перемешивании

до pH 7,5. Смолу отфильтровывали, фильтрат наносили на колонку, содержащую 1 мл дауэкса 50 (Bu_4N^+). Продукт элюировали водой, измеряли оптическое поглощение элюата при 267 нм и упаривали досуха. Маслообразный продукт высушивали и использовали в качестве P_3 -компонента на следующей стадии.

Межнуклеотидная реакция алкилирования при синтезе аналога (V) (первая стадия, типовая методика). К раствору P_3 -компонента ($(\text{Bu}_4\text{N}^+)_2$ -соль тиофосфата (Iб), 20 мкмоль) в 0,6 мл DMF прибавляли I-компонент (мономер (IIб), 24 мкмоль), перемешивали, выдерживали 2 мин, отбирали пробу (2 мкл) для иодометрического определения концентрации P_3 -компонента [9, 10]. К реакционной смеси добавляли 0,05 М раствор LiI в ацетоне (20 мл), осадок отфильтровывали, промывали ацетоном (2×5 мл) и высушивали.

Доблокирование P_3 -групп при синтезе аналога (V). Продукт межнуклеотидной реакции алкилирования (20 мкмоль по исходному тиофосфату (Iб)) растворяли в 1 мл 1 М LiOH, выдерживали 0,5 ч и наносили на колонку, содержащую в верхней части дауэкс 50 (Pu^+) (1 мл), а в нижней — дауэкс 50 (Bu_4N^+) (1 мл). Продукт элюировали водой, pH раствора доводили на pH-метре 0,04 М Bu_4NOH до значения 7,5, упаривали досуха, высушивали. Продукт использовали в качестве P_3 -компонента на следующей стадии.

Удаление защитных групп с оснований. Продукт межнуклеотидной реакции алкилирования на последней, 15-й стадии осаждали 0,05 М раствором LiI в ацетоне, отфильтровывали, промывали ацетоном (2×5 мл), высушивали, растворяли в конц. растворе аммиака (марки ос. ч., 10 мл) и выдерживали 2 сут при 20° С. Раствор упаривали и использовали далее для хроматографического выделения ($1/2$ часть).

Выделение аналогов (IV) и (V). Условия выделения аналогов приведены на рис. 1 и 2. После гель-хроматографии соединения (IV) фракции, соответствующие центральной части первого пика, объединяли, измеряли оптическое поглощение при 267 нм и упаривали досуха. Для удаления бикарбоната аммония остаток растворяли в 40% водном спирте (50 мл) и снова упаривали. Эту операцию повторяли еще 3 раза, получая чистый продукт (IV). После ионообменной хроматографии аналога (V) фракции, соответствующие центральной части последнего пика, объединяли, измеряли оптическое поглощение при 260 нм и наносили на колонку для обращенно-фазовой хроматографии. Фракции, соответствующие основному пику, объединяли, упаривали до объема 1 мл и обессоливали на колонке с сефадексом G-25 ($1,7 \times 25$ см), элюируя вещество водой со скоростью 25 мл/ч. Фракции пика объединяли, упаривали до объема 1 мл и пропускали через колонку с катионитом Chelex 100 (Na^+) (2 мл). Вещество элюировали водой, измеряли его концентрацию спектрофотометрически, упаривали досуха и хранили при -20° С. Соединения (IV) и (V) были гомогенны при микроколоночной хроматографии на аминохроме AC-80 (рис. 1 и 2), их УФ-спектры в воде имеют соответственно $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм, $\lambda_{\text{мин}}$ 233 нм и $\lambda_{\text{макс}}$ 265 нм, $\lambda_{\text{мин}}$ 236 нм.

Установление нуклеотидной последовательности в аналоге (V). Первичную структуру аналога (V) анализировали по методике, приведенной в работе [5], используя модифицированный метод Бу [11]. Гомохроматографию проводили на пластинке размером 20×30 см, пробег маркера-красителя ксиленинанола составил 20 см. Результат анализа подтверждает структуру соединения (V).

ЛИТЕРАТУРА

1. Богачев В. С., Кумарев В. П. Биоорганическая химия, 1985, т. 11, № 11, с. 1547—1555.
2. Chladek S., Nagyvary J. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 6, p. 2079—2085.
3. А. с. 910651 (СССР). Способ получения олигодезокситимидилатов/Кумарев В. П., Богачев В. С., Баранова Л. В., Кобзев В. Ф. Заявл. 30.09.76, № 2414492. Оpubл. в Б. И., 1982, № 9.
4. А. с. 899571 (СССР). Олигодезокситионуклеотиды, проявляющие матричные свойства в РНК-полимеразной системе *E. coli*/Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В., Ривкин М. И. Заявл. 13.07.79, № 2798760. Оpubл. в Б. И., 1982, № 3.

5. Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В., Ривкин М. И., Рыбаков В. Н. Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1525-1534.
6. Попанов В. А., Рыбаков В. Н., Богачев В. С., Ривкин М. И., Кумарев В. П. Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 7, с. 954-957.
7. Рыбаков В. Н., Ривкин М. И., Богачев В. С., Кумарев В. П. Биоорганич. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1423-1425.
8. Rybakov V. N., Rivkin M. I., Kumarev V. P. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 1, p. 189-201.
9. Богачев В. С., Кумарев В. П. Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1984, № 5, вып. 2, с. 123-130.
10. Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В. Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1516-1524.
11. Tu C. P. D., Jay E., Bahl C. P., Wu R. Anal. Biochem., 1976, v. 74, № 1, p. 74-93.
12. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, № 2, p. 331-353.
13. Бенкер Г. и др. Органикум. М.: Мир, 1979, т. 2, с. 353.

Поступила в редакцию
12.V.1985

PHOSPHOTHIOPATE ANALOGUES OF NUCLEIC ACIDS. V. THE SYNTHESIS OF 5'-PHOSPHOTHIOPATE ANALOGUES OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES VIA ZWITTER-ION INTERMEDIATES

BOGACHEV V. S., KUMAREV V. P., RYBAKOV V. N.

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

A modified method for the synthesis of 5'-phosphothioester analogues of oligodeoxynucleotides has been developed. It is based on the alkylation reaction between Bu_4N^+ -salts of deoxynucleoside 3'-phosphothioates (Np_s) and new zwitter-ion nucleotide monomers — 2',5'-dideoxy-5'-iodonucleoside-3'-O-{S- β -[N-(*p*-diethylmethylamino)phenyl]-carbamoylethyl}phosphothioates in DMF. The use of those monomers and salts of Np_s results in 100-fold increase of the alkylation rate as compared with the earlier procedure. The efficiency of the method was illustrated by the synthesis of 5'-phosphothioester analogues of hexathymidylate and hexadecadeoxynucleotide d(CCATCCTTCCATTTG) with 51,6 and 42% yields, respectively. Nucleotide sequence of the latter analogue, corresponding to the synthetic angiotensin I gene, was proved by the modified fingerprinting technique.