



УДК 547.963.057

## ТИОФОСФАТНЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

VI\*. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ С  
3'-ФОСФОТИОМЕТИЛЬНОЙ ГРУППОЙ ДЛЯ ФОСФОТРИЭФИРНОГО  
СИНТЕЗА ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ*Кумарев В. П., Баранова Л. В., Богачев В. С.,  
Лебедев А. В.\*, Обухова Л. В.**Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск;  
\* Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Разработан модифицированный фосфотриэфирный метод синтеза олигодезоксирибонуклеотидов. Метод включает синтез полностью защищенных дезоксинуклеотидов — 5'-диметокситриэтил-N-ацилнуклеозид-3'-(β-цианэтил)-3'-(S-метил)тиофосфатов, получение из них соответствующих нуклеозидных и нуклеотидных компонентов и проведение реакции конденсации между последними в пиридине в присутствии известных конденсирующих агентов. Предложенный метод позволяет синтезировать олигодезоксирибонуклеотиды в растворе с использованием моно-, ди- и тримеров без применения хроматографической очистки на промежуточных стадиях с выходом конечного продукта 5–25%.

Описанным методом получены олигодезоксинуклеотиды длиной от 8 до 18 мономерных звеньев, которые затем были использованы для ферментативного синтеза, клонирования и экспрессии гена гормона ангиотензина I человека и фрагмента гена фибробластного интерферона человека.

В работах [2, 3] нами было описано получение дезоксинуклеотидов с различными 3'-фосфотиоалкильными группами, которые были успешно использованы в синтезе 5'-тиофосфатных аналогов нуклеиновых кислот. Представляло интерес попытаться использовать 3'-фосфотиоалкильные производные дезоксинуклеозидов в качестве исходных мономеров для фосфотриэфирного синтеза природных олиго- и полинуклеотидов.

В настоящем сообщении описаны синтез, свойства и применение 5'-O-диметокситриэтил-N-ацилнуклеозид-3'-(β-цианэтил)-3'-(S-метил)тиофосфатов для триэфирного синтеза олигонуклеотидов. Эти производные нашли успешное применение в синтезе дезоксиолигонуклеотидов для сборки гена гормона ангиотензина I человека [4, 5], гена фибробластного интерферона человека и для некоторых молекулярно-биологических исследований [6, 7].

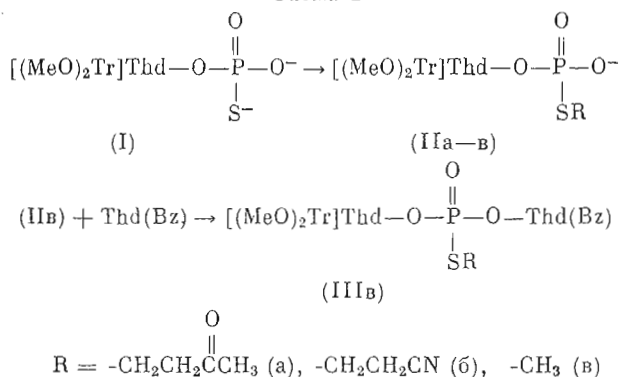
Как видно из сравнения скоростей гидролиза триалкильных O- и S-эфиров, атом фосфора в тиофосфорных кислотах более электрофилен, чем в фосфорной кислоте; триалкильные S-эфиры гидролизуются в 1000 раз быстрее, чем соответствующие производные фосфорной кислоты [8]. Как следствие этого, производные тиофосфорной кислоты имеют более низкие значения pK по сравнению с производными фосфорной кислоты [9]. Кроме того, диэфирные производные тиофосфатов достаточно устойчивы как в кислых, так и в щелочных средах [10]. Эти данные позволяли предположить, что 3'-фосфотиоалкильные производные нуклеозидов будут реагировать с нуклеозидным компонентом в присутствии конденсирующего реагента с образованием алкилтиофосфотриэфира, а S-алкильная группа будет достаточно легко и селективно удаляться с межнуклеотидного фосфата с образованием фосфодиэфира.

Для проверки этих предположений из 5'-диметокситриэтилтимидин-3'-тиофосфата были получены производные (IIa–в) (см. схему 1) и введены

\* Сообщение V см. [1]. (MeO)<sub>2</sub>Tr — диметокситриэтил. Префикс «d» в обозначении дезоксинуклеотидов для краткости опущен.

в реакцию конденсации с 3'-О-бензоилтимидином в присутствии *n*-толуол-сульфотетразола.

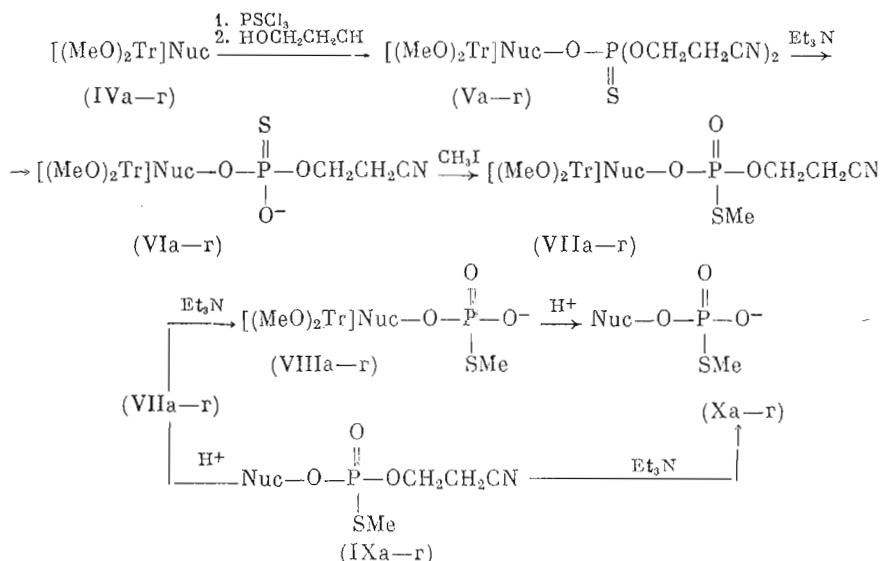
Схема 1



Оказалось, что триэфир (III) образуется только из метилтиофосфата (IIв), а из соединений (IIа) и (IIб) были получены неидентифицированные продукты. Продукт (IIIв) был выделен с помощью хроматографии на силикагеле и обработан 0,1 М раствором гидроокиси лития в водном диоксиде или фторидом тетрабутиламмония в диоксиде. В обоих случаях был получен динуклеозидфосфат, который, по данным ТСХ на силикагеле, был идентичен контрольному образцу, полученному из 5'-диметокситри-тилтимидин-3'-*n*-хлорфенилфосфата и 3'-бензоилтимидина по методу Наранга [11].

Поскольку предположение о пригодности дезокси-3'-(S-алкилтио)фосфатов в фосфотриэфирном синтезе олигодезоксирибонуклеотидов подтвердилось, нами были синтезированы производные четырех дезокси-нуклеотидов, (VIIа-г), (VIIIа-г), (IXа-г), по схеме 2.

Схема 2



Nuc = Thd (а), 4bzCyd (б), 6bzAdo (в), 2ibGuo (г)

Синтезированные соединения были идентифицированы на основании спектральных и хроматографических данных (табл. 1). Кроме того, для доказательства структуры полученных соединений были записаны  $^{31}\text{P}$ - и  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры. В  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектрах соединений (VIIIа-г) регистрируется только один синглетный сигнал в области 17-18 м.д. (см. табл. 2), характерный для производных нуклеотидов, содержащих фрагмент P-S-CH<sub>3</sub> [12]. В спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, записанных без гетероядерного подав-

## Характеристики синтезированных соединений

Соединение	$R_f$ в системе*				УФ-спектры	
	А	Б	В	Г	$\lambda_{\max}$ , нм (ε)	$\lambda_{\min}$ , нм (ε)
(IXa)	0,73	0,65	0,40		282 (18300)	253 (11000)
(IXб)	0,80	0,70	0,42		264 (22100)	235 (8700)
					306 (24500)	
(IXв)	0,65	0,41	0,30		267 (8750)	236 (2500)
(IXг)	0,54	0,40	0,25		260 (176000)	233 (5700)
					287 (11600)	
(VIIIa)	0,09	0,06	0	0,73	283 (19500)	257 (12000)
(VIIIб)	0,18	0,09	0	0,79	265 (23000)	250 (9600)
					306 (25300)	287 (4200)
(VIIIв)	0,08	0,02	0	0,68	268 (9700)	236 (3500)
(VIIIг)	0,07	0,02	0	0,61	260 (17700)	230 (6500)
					286 (12500)	275 (3400)
(VIIa)			0,7			
(VIIб)			0,82			
(VIIв)			0,63			
(VIIг)			0,58			

\* ТСХ на силикагеле.

Таблица 2

Значения химических сдвигов в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР производных мононуклеотидов (VIII) и (IX)

Соединение	$\delta^*$	Соединение	$\delta^{**}$
(IXa)	29,09	(VIIIa)	17,85
(IXб)	29,09	(VIIIб)	17,47
(IXв)	29,21	(VIIIв)	17,39
(IXг)	29,23	(VIIIг)	17,15

\* Во всех случаях приведено положение центра сигнала двух диастереомеров.

\*\*  $J_{\text{PSCN}_3} = 12,5 - 13,0$  Гц.  $J_{\text{PO}_3\text{CN}} = 10,0$  Гц.

ления спин-спинового взаимодействия  $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ , регистрируется дублет кватетов с константой спин-спинового взаимодействия (КССВ)  $J_{\text{PO}_3\text{CN}} \sim 10$  Гц и  $J_{\text{PSCN}_3} \sim 12,5-13$  Гц (см. табл. 2), что также согласуется со структурами (VIIIa-г).

В случае соединений (IXa-г) спектры ЯМР должны быть более сложными в связи с наличием асимметрического атома фосфора, т. е. двух диастереомеров. Действительно, в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, записанных с подавлением спин-спинового взаимодействия  $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ , регистрировались два слабо разрешенных синглета в области 29 м.д. Для производных нуклеотидов, содержащих связь  $\text{P}=\text{S}$ , известно, что область резонанса триэфирных производных смещена в область слабого поля на 15-20 м.д. по сравнению с областью резонанса диэфирных производных [13]. Аналогичную тенденцию можно ожидать для соединений, содержащих серу и во фрагменте  $\text{P}-\text{S}-\text{R}$ , т. е. при переходе от соединений (VIIIa-г) к соединениям (IXa-г). Действительно, наблюдаемые изменения химических сдвигов согласуются с этим предположением (см. табл. 2).

В спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР соединений (XIa-г) обнаружены и отнесены сигналы всех протонов гетероциклических оснований, 2'-дезоксирибозы, S-метильной, 2-цианэтильной групп (см. табл. 3, 4). В ряде случаев удалось провести анализ тонкой структуры сигналов протонов (1'-H, 3'-H, 4'-H и др.). Для некоторых протонов детальный анализ структуры сигнала

не был проведен из-за перекрывания сигналов отдельных диастереомеров. Можно отметить, что наибольшее различие химических сдвигов протонов диастереомеров обнаружено для 4'-Н и протонов гетероциклических оснований. В то же время для диастереомеров не обнаружено существенного различия в химических сдвигах протонов 1'-Н, Н-СН<sub>2</sub>CN и некоторых других (см. табл. 3).

Вся совокупность данных спектров ЯМР согласуется с приведенными структурами и доказывает отсутствие Н- и Р-содержащих примесей в полученных соединениях.

В процессе синтеза и выделения мономеров было установлено, что нуклеозидные компоненты (IXа) и (IXг) плохо растворимы в хлороформе и хлористом метиле и хорошо растворимы в воде, а производные (Ха-г) все хорошо растворимы в воде и совершенно не растворимы в хлороформе и хлористом метиле. Гидрофильные свойства этих соединений были использованы нами при синтезе олигодезоксирибонуклеотидов для сокращения или полного исключения хроматографической очистки на промежуточных стадиях. С этой целью при наращивании олигомера очередной мономер выбирали таким образом, чтобы он содержал ту же защитную группу, которую предполагалось удалять с целевого олигонуклеотида для дальнейшего наращивания цепи. Таким образом, каждый раз конечная реакционная смесь содержала целевой олигонуклеотид, хорошо растворимый в хлороформе и нерастворимый в воде, и мономеры (IXа) и (IXг) или (Ха-г), хорошо растворимые в воде и практически нерастворимые в хлороформе. Для синтеза более длинных олигомеров (12-18-членных) был получен полный набор нуклеозидных и нуклеотидных компонентов из димеров и тримеров (данные ТСХ и УФ-спектров см. в табл. 5). Синтез проводили ступенчатым методом, наращивая олигонуклеотидную цепь в (3'→5')-направлении, а также в обратном направлении, исходя из полного набора производных (Ха-г) и (IXа-г) или соответствующих блоков. Как правило, исходные нуклеотидный (Ха-г) и нуклеозидный (IXа-г) компоненты брали в эквимолярном соотношении, что позволяло при практически количественном выходе олигодезоксирибонуклеотидов упростить состав конечной реакционной смеси и тем самым облегчить выделение целевого продукта. Конденсацию проводили в абсолютном пиридине, в качестве конденсирующих агентов использовали тетразолиды и нитротриазолиды бензол-, толуол- и триизопропилсульфокислот, а также смеси соответствующих сульфохлоридов с тетразолом, нитротриазолом, 1-метил- и 1-бензимидазолом. Опыт работы с перечисленными конденсирующими агентами показал, что при концентрации нуклеотидов, равной 0,1-0,2 М, реакция заканчивалась за 15-30 мин. Эти условия использовали для синтеза ди-, три- и тетра-нуклеотидных блоков. При синтезе более длинных блоков концентрация нуклеотидного и нуклеозидного компонентов была равной 0,01-0,05 М и соответственно время реакции составляло ~60 мин. Использование системы арилсульфохлорид-1-метилимидазол давало некоторое количество побочного продукта из нуклеотидного компонента, поэтому эта система была использована только для получения ди- и три-нуклеотидных блоков. Поскольку при экстракции реакционной смеси хлороформом мезитилеи- и триизопропилсульфокислоты не отмывались полностью водой, мы использовали для конденсации только *n*-толуолсульфохлорид с 1-метилимидазолом или *n*-толуолсульфонитриазол. Об окончании реакции конденсации судили по исчезновению исходных компонентов при хроматографии на пластинках с силикагелем в системе В. По окончании реакции в реакционную смесь добавляли воду и пиридин удаляли упариванием на ротационном испарителе. Удаление 5'-диметоксиэтилтильной и цианэтильной защитных групп проводили обычным методом (см. «Экспериментальную часть»).

Для определения условий деблокирования межнуклеотидных тиометильных защитных групп было проведено сравнительное изучение отщепления этих групп при действии 0,1 М водного раствора гидроксида лития, *n*-нитробензальдоксимата лития [12], *n*-нитробензальдоксимата N,N,N',N'-тетраметилгуанидина [12] и концентрированного водного аммиака [14]

Значения химических сдвигов необмениваемых протонов в спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР

Соединение	1'-Н *	2'-Н <sup>2*</sup>	2''-Н <sup>2*</sup>	3'-Н *	4'-Н <sup>3*</sup>	5',5''-4 <sup>4*</sup>	2-Н <sup>3*</sup>
(IXa)	6,90	2,79	2,68	5,64	4,53 4,46	4,07	—
(IXб)	6,75	3,10	2,73	3,65	4,66 4,59	4,11	—
(IXв)	6,83	3,32	2,92	5,78	4,68	4,08	8,85 8,84
(IXг)	6,47	3,18	2,81	5,62	4,63 4,57	4,00	—

\* Сигналы двух диастереомеров совпадают ( $\pm 0,005$  м. д.).

<sup>2\*</sup> Значение химического сдвига для центра сигнала двух диастереомеров ( $\pm 0,02$  м. д.).

<sup>3\*</sup> Значения химических сдвигов для двух диастереомеров ( $\pm 0,005$  м. д.).

<sup>4\*</sup> Приведено положение центра сигнала двух протонов. Значения химических сдвигов 5'-Н и 5''-Н совпадают для двух диастереомеров.

на олигодезоксирибонуклеотид, очищенный до гомогенного состояния на колонке с силикагелем. Было установлено, что для гидролиза тиометильной защиты наиболее целесообразно использование аммиака. Количественное деблокирование водным аммиаком при комнатной температуре практически завершается за сутки, в то время как гидролиз остальными реагентами в тех же условиях проходит на 30–50%. Кроме того, удаление тиометильной защиты аммиаком — удобная и количественная операция, поскольку аммиак после выделения целевого продукта легко удаляется упариванием на ротационном испарителе, а в остальных случаях требуется нейтрализация реакционной смеси уксусной кислотой и экстракция ненуклеотидного материала хлороформом. Особое значение при выборе условий деблокирования защитной группы имеет степень расщепления межнуклеотидных связей. Анализ нуклеотидного материала с помощью ионообменной хроматографии после обработки олигодезоксирибонуклеотидов водным раствором аммиака показал, что деблокирование протекает без существенного расщепления межнуклеотидных связей, что видно из рис. 1. Согласно полученным данным, наиболее полное удаление тиометильной защиты происходит при использовании водного 50% раствора аммиака, полученного насыщением при 0° С.

При синтезе олигодезоксирибонуклеотидов описанным способом вначале мы использовали специальные 3'-концевые мономеры, а именно 3'-О-бензоилнуклеозиды. Однако, принимая во внимание, что тиоэтильная [15], а также тиометильная [16] концевые защитные группы могут быть деблокированы действием специфических реагентов, а именно окислением раствором иода, в дальнейшем мы также использовали окисление иодом в смеси вода — пиридин при снятии тиометильной защиты с олигодезоксинуклеотидов с 3'-концевым фосфатом. Деблокирование тиометильной группы проводили после удаления диметокситриэтильной группы 80% уксусной кислотой. Степень деблокирования определяли ионообменной хроматографией. Пик, соответствующий олигодезоксирибонуклеотиду с деблокированной защитной группой, имел на один отрицательный заряд больше по сравнению с пиком, соответствующим исходному олигомеру (рис. 2). Это позволило исключить синтез четырех дополнительных 3'-О-бензоилнуклеозидов.

Выделение целевых олигодезоксинуклеотидов проводили последовательно ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией (рис. 3 и 4).

При использовании димеров выход целевых олигодезоксирибонуклеотидов длиной 12 мономерных звеньев после удаления всех защитных групп составил в расчете на исходный мономер 1–10%. В случае синтеза из тримеров выход целевых олигодезоксирибонуклеотидов длиной в 12 мономерных звеньев в расчете на исходный тринуклеотид составил 3–25%.

производных мононуклеотидов (IX) в пиридине- $d_5$ 

5-Н <sup>3*</sup>	6-Н <sup>3*</sup>	8-Н <sup>3*</sup>	СН <sub>2</sub> <sup>3*</sup>	СН <sub>2</sub> <sup>2*</sup> CN	СН <sub>2</sub> <sup>2*</sup> OP	С <sub>6</sub> Н <sub>5</sub> <sup>*</sup>	СН <sub>2</sub> <sup>3*</sup>	СН <sup>*</sup>
—	7,93 7,89	—	2,27 2,26	3,00	4,43	—	1,72 1,73	—
7,58 7,57	8,62 8,58	—	2,26 2,28	3,02	4,44	7,39 7,47 8,12	—	—
—	—	8,94	2,32	3,05	4,49	7,42 7,37 8,12	—	—
—	—	8,55 8,52	2,34 2,33	3,101	4,53	—	1,19 1,18	2,86

Предложенный метод синтеза, основанный на использовании полного набора мономеров, димеров и тримеров с тиометильной защитной группой на 3'-фосфате, был широко использован нами в синтезе олиго- и поли-дезоксирибонуклеотидов.

## Экспериментальная часть

В работе использовали 2'-дезоксинуклеозиды (Merck, ФРГ), PSCl<sub>3</sub> (Merck, ФРГ), Nucleosil C-8 (Macherey and Nagel, ФРГ), силикагель КСК (опытное производство НИОХ СО АН СССР), аминокром (получен в НИС НГУ и ИЦиГ СО АН СССР).

ТСХ проводили на пластинках Silufol (Kavalier, ЧССР) в системах хлороформ — метанол, 6:1 (А), 4:1 (Б), 9:1 (В), 1:1 (Г). Обнаружение продуктов на хроматограммах проводили реактивом Динше, тиофосфатных производных — парами иода, диметокситритильных производных — парами HCl, значения R<sub>f</sub> приведены в табл. 1.

УФ-спектры записывали на регистрирующем спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР). Целевые олигодезоксинуклеотиды после удаления всех защитных групп выделяли ионообменной хроматографией на колонках с аминокромом (при разделении применяли 15 см<sup>3</sup> сорбента на 5–10 мкмоль продукта), используя для элюции линейный градиент концентрации КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, рН 7 (0→0,4 М). Синтез соединений (IVa–г) осуществляли по методу Кораны [17]. Абсолютные растворители готовили по методу [18] и хранили над молекулярными ситами 4А. Пиридин готовили перегонкой над щелочью, пятиокисью фосфора, толуолсульфохлоридом и хранили над молекулярными ситами 4А. Исходные блокированные ди- и тридезоксинуклеотиды хранили в виде 0,1 М растворов в абсолютном пиридине при –15°С в течение 2–3 мес, для более длительного хранения при –15°С ди- и тридезоксинуклеотиды

Таблица 4

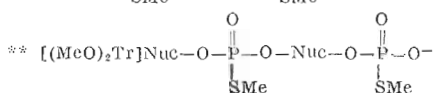
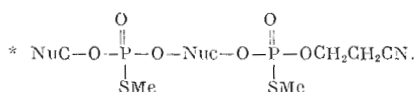
## Значения некоторых констант спин-спинового взаимодействия (Гц) для производных мононуклеотидов (IX) \*

Соединение	J <sub>1'-H, 2'-H</sub> J <sub>1'-H, 2'-H</sub>	J <sub>2'-H, 3'-H</sub>	J <sub>2'-H, 3'-H</sub>	J <sub>3'-H, 4'-H</sub>	J <sub>4'-H, 5'-H</sub> J <sub>4'-H, 5'-H</sub>	J <sub>H-CH<sub>2</sub>, 6-H</sub>	J <sub>5'-H, 6-H</sub>	J <sub>(СН<sub>2</sub>)СН<sub>2</sub></sub>
(IXa)	7,8 6,3	2,5	—	2,5	2,5 2,5	1,0	—	—
(IXб)	6,3 6,9	2,5	7,0	2,5	3,0 2,5	—	7,4	—
(IXв)	7,8 6,1	6,0	1,0	2,0 2,0	3,0 3,0	—	—	—
(IXг)	8,0 6,0	6,5	2,0	1,0	3,0 3,0	—	—	6,4

\* Во всех случаях J<sub>PSCl<sub>3</sub></sub> 15,4 ± 0,2, J<sub>СН<sub>2</sub>OP</sub> 6,5 ± 1,0, J<sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub></sub> 5,9 ± 0,2, J<sub>3'СНОP</sub> 8,0 ± 1 Гц.

## Свойства синтезированных соединений

Соединение *	УФ-спектр		Соединение **	УФ-спектр	
	$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\min}$		$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\min}$
	нм (ε)			нм (ε)	
AC	268 (40400)	238 (19700)	AC	235 (47300)	253 (37000)
CA	269 (40400)	235 (19700)	CA	270 (41300)	230 (39600)
CC	263 (44200)	235 (17400)	CA	238 (53800)	252 (38800)
	335 (49000)	290 (16250)		269 (41300)	228 (33000)
AA	282 (36600)	252 (22000)	CC	264 (45000)	248 (36400)
GA	263 (35000)	231 (16700)		307 (50000)	287 (16400)
	282 (29900)	271 (32000)		240 (плечо)	230 (18400)
AG	263 (35000)	232 (16700)	AA	287 (37500)	256 (23000)
	281 (29900)	271 (32900)		237 (плечо)	
TA	228 (27000)	242 (14500)	AG	240 (26000)	250 (25000)
AT	278 (27000)	241 (14500)		260 (36000)	271 (25700)
CT	267 (30800)	233 (11200)		283 (31000)	
TC	270 (30800)	236 (11200)	GA	240 (29200)	250 (25000)
CG	260 (38800)	230 (14400)		260 (36000)	270 (25600)
	290 (36100)			283 (31000)	
GC	261 (38800)	230 (14400)	TA	280 (28000)	253 (15500)
	290 (36100)			236 (плечо)	
TG	263 (25450)	232 (8200)		278 (28000)	254 (5500)
GT	262 (25450)	235 (8200)		236 (плечо)	
GG	260 (33400)	235 (11400)	CT	243 (30600)	232 (26500)
	287 (23400)	272 (23900)		266 (32000)	253 (27130)
TT	267 (17500)	235 (5000)		313 (10430)	300 (9740)
			TC	242 (30500)	230 (12200)
				271 (32000)	252 (27000)
				310 (плечо)	300 (9600)
			CG	240 (плечо)	228 (15400)
				295 (37000)	246 (31100)
			GC	240 (плечо)	230 (15400)
				260 (40000)	246 (30000)
				300 (37000)	
			TG	263 (26500)	248 (14500)
			GT	240 (плечо)	230 (9200)
				264 (26500)	247 (24200)
			GG	240 (плечо)	228 (12400)
				260 (34500)	275 (25500)
				285 (24400)	
			TT	235 (плечо)	
				268 (18500)	250 (15000)



Nuc = Thd(T), 4bzCyd(C), 6bzAdo(A), 2ibGuo(G).

выделяли в виде сухого остатка добавлением к пиридиновому раствору смеси абсолютных эфира и пентана, 1 : 1.

Спектры  $^{31}\text{P}$ -ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 (Bruker, ФРГ) на частоте 36,43 МГц при 30° С (химические сдвиги приведены в м. д. от 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР — на спектрометре WP-200 (Bruker, ФРГ) на частоте 200 МГц при 30° С (химические сдвиги приведены в м. д. от тетраметилсилана как внутреннего стандарта).

*Синтез 5'-О-диметокситритил-N-ацилнуклеозид-3'-(β-цианэтил)-3'-(S-метил)тиофосфатов (VIIa-г) (общая методика).* 20 ммоль  $\text{N}^6$ -бензоилдезоксиаденозина,  $\text{N}^4$ -бензоилдезоксицитидина,  $\text{N}^2$ -изобутирилдезоксигуанозина или тимидина растворяли в 200 мл абсолютного пиридина и упаривали на ротационном испарителе до объема 100 мл. Добавляли 6,9 г (20,2 ммоль) диметокситритилхлорида и выдерживали 1–2 ч при 20° С.

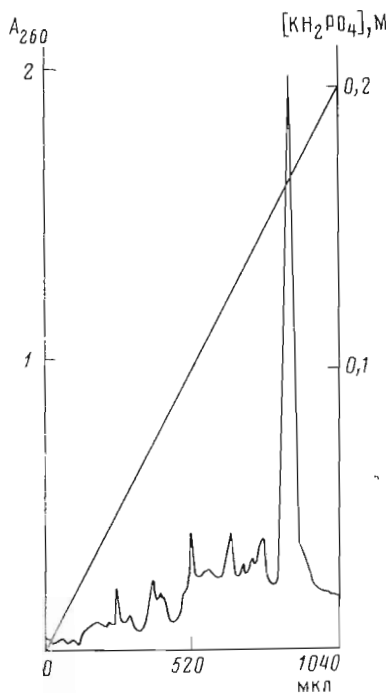


Рис. 1

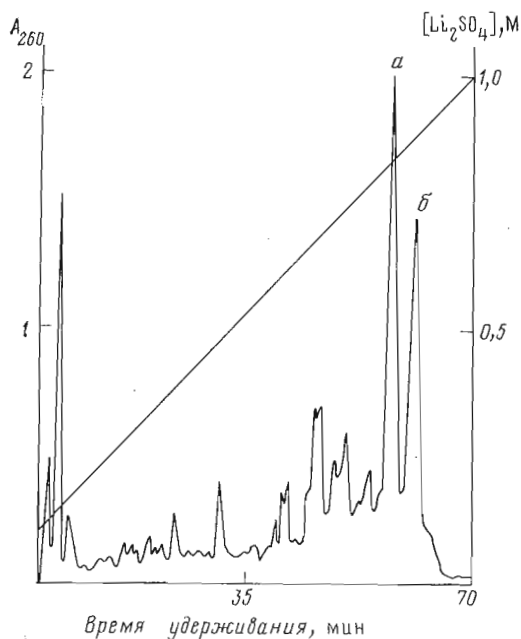


Рис. 2

Рис. 1. Микроколоночная хроматография нонануклеотида ААТТССАТGr на колонке (2×60 мм) с амниохромом в градиенте концентрации  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 7) в 7 М мочеvine. Скорость элюции 50 мкл/мин

Рис. 2. Микроколоночная хроматография пентадекануклеотида GATCGTGTTTATATGr, содержащего концевую 3'-тиометильную защитную группу (а), и этого же пентадекануклеотида с деблокированной концевой 3'-тиометильной защитной группой (б) на колонке (2×60 мм) с амниохромом в градиенте концентрации  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  в 7 М мочеvine (рН 7). Скорость элюции 50 мкл/мин

Контроль за ходом реакции осуществляли с помощью ТСХ в системе В. К охлажденной до  $0^\circ\text{C}$  реакционной смеси добавляли охлажденный раствор 33,9 г (200 ммоль) тиофосфорилхлорида в пиридине (4 : 1 по объему). Выдерживали 2–3 ч при  $5^\circ\text{C}$  и после окончания реакции (контроль с помощью ТСХ в системе В) раствор упаривали в вакууме до масла при температуре бани не выше  $20^\circ\text{C}$ . Затем реакционную смесь упаривали с пиридином (2×50 мл), охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ , прибавляли 100 мл раствора 20 ммоль этилендиангидрина в пиридине и оставляли нагреваться до  $20^\circ\text{C}$ . Через 1–2 ч к раствору добавляли 250 мл смеси триэтиламин – пиридин – вода (1 : 0,5 : 1) и выдерживали 1–2 ч при  $20^\circ\text{C}$ . Упаривали раствор в вакууме до масла, растворяли в 500 мл хлороформа, промывали водой (2×100 мл), сушили безводным сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Масло упаривали с абсолютным ацетонитрилом (2×100 мл) для удаления остатков пиридина, остаток растворяли в 100 мл абсолютного ацетонитрила, добавляли 12,5 мл (200 ммоль) иодистого метила и выдерживали 20–30 мин. Раствор упаривали в вакууме, растворяли остаток в 200 мл хлороформа, промывали 5% раствором тиосульфата натрия (20 мл) и водой (2×20 мл), сушили безводным сульфатом натрия и упаривали.

*Удаление цианэтильной защиты (общая методика).* Полностью защищенный дезоксинуклеотид (VIIa–г) (1 ммоль) растворяли в 10 мл смеси триэтиламин – пиридин – вода (1 : 1 : 0,5), выдерживали 20 мин при  $20^\circ\text{C}$ , упаривали, остаток упаривали с толуолом, затем: а) мономеры выделяли хроматографией на колонке (30×6 см) с силикагелем в линейном градиенте метанола в хлороформе (с добавлением 1% пиридина) (0→30%). Выход соединений (VIIa–г) 60–70%; б) олигомеры упари-



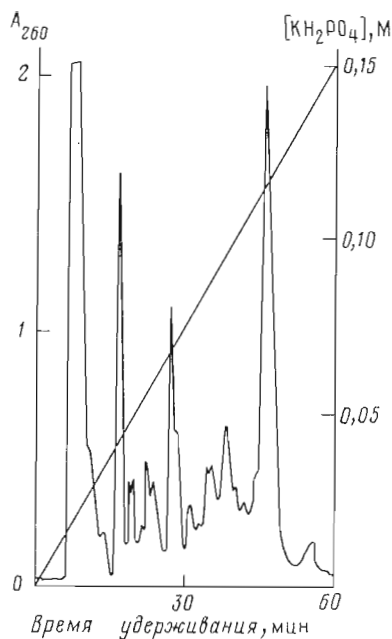


Рис. 3

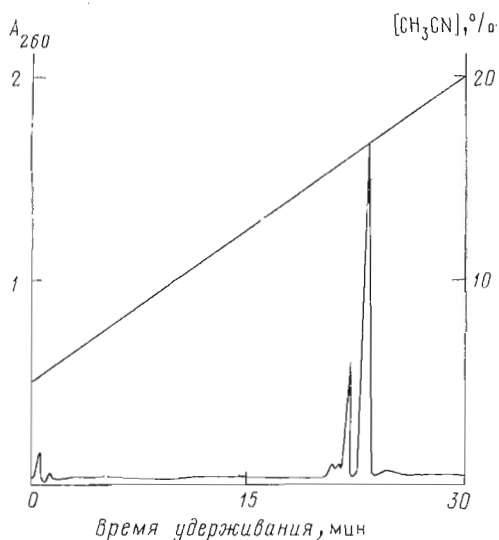


Рис. 4

Рис. 3. Ионобменная хроматография реакционной смеси, содержащей додекануклеотид GGATGGATGTAAr, на колонке (0,9×12 см) с аминохромом в градиенте концентрации  $\text{K}_2\text{PO}_4$  (рН 7). Скорость элюции 2 мл/мин

Рис. 4. Обращенно-фазовая хроматография додекануклеотида GGATGGATGTAAr на колонке (0,9×12 см) с нуклеосилом С-8 (размер частиц 5 мкм) в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1 М ацетате аммония (рН 6). Скорость элюции 2 мл/мин

вали до масла и использовали в следующей реакции конденсации. После удаления цианэтильной защиты получали не менее 95% нуклеотидного компонента.

*Удаление диметокситритильной защиты (общая методика).* Полностью защищенный дезокси-нуклеотид (VIIa–г) (1 ммоль) обрабатывали 0,5 г трихлоруксусной кислоты в хлороформе (10 мл) в течение 2–5 мин, нейтрализовали раствором пиридина, промывали водой, сушили безводным сульфатом натрия, затем: а) мономеры упаривали с толуолом и выделяли хроматографией на колонке (30×6 см) с силикагелем в линейном градиенте метанола в хлороформе (0→10%). Выход соединений (IXa–г) 95–100%; б) олигомеры упаривали до масла и использовали в следующей реакции конденсации. После удаления диметокситритильной защиты получали 90–95% нуклеозидного компонента.

*Синтез динуклеотидных и тринуклеотидных блоков (общая методика).* Соединение (VIIIa–г) (1 ммоль) и соединение (IXa–г) (1 ммоль) растворяли в 50 мл абсолютного пиридина, добавляли 0,7 мл (10 ммоль) 1-метилимидазола и упаривали в вакууме ротационного испарителя до масла. Впускали абсолютный пиридин в колбу под вакуумом и снова упаривали. При третьем упаривании оставляли в колбе объем реакционной смеси ~10 мл, выпускали сухой воздух и добавляли 580 мг (3 ммоль) *n*-толуолсульфохлорида из поллой пробки, которой затем закрывали колбу. Через 15–30 мин реакционную смесь обрабатывали двумя путями. Если в дальнейшем динуклеотид использовали в качестве нуклеотидного компонента, то удаляли цианэтильную защиту в условиях общей методики, если же в качестве нуклеозидного, то реакционную смесь упаривали в вакууме до масла, затем три раза упаривали со смесью этанол–толуол (1:1), растворяли в хлороформе и удаляли диметокситритильную защиту в условиях общей методики.

Для получения тринуклеотидов к димерным нуклеозидным или нуклеотидным компонентам добавляли 1 ммоль мономеров (VIIIa–г) или

(IXa—г), сушили упариванием с абсолютным пиридином (3×5 мл), прибавляли 10 мл абсолютного пиридина, 0,58 г (3 ммоль) толуолсульфохлорида и 0,74 г (9 ммоль) 1-метилимидазола, выдерживали 30 мин и проводили ТСХ в системе Б для установления времени окончания реакции. По окончании реакции добавляли 0,1 мл воды, 5 мл хлороформа, промывали хлороформный раствор водой (4×2 мл), органическую фракцию упаривали, делили на две части и удаляли либо диметокситритильную, либо цианэтильную защиту в условиях, описанных ранее. Получали нуклеозидные и нуклеотидные компоненты тримеров.

Очистку целевых защищенных динуклеотидных и тринуклеотидных блоков проводили на колонке (3×12 см) с силикагелем в линейном градиенте метанола в хлороформе (с добавлением 1% пиридина) (0→30%) в случае нуклеотидных компонентов или в градиенте метанола в хлороформе (0→10%) в случае нуклеозидных компонентов. Выход защищенных динуклеотидов 70–95%, защищенных тринуклеотидов 60–90%.

*Синтез олигодезоксирибонуклеотидов (общая методика).* По 10 мкмоль димерных нуклеозидного и нуклеотидного компонентов (по 100 мкл 0,1 М растворов в абсолютном пиридине) упаривали в вакууме на ротационном испарителе до масла. Впускали абсолютный пиридин в колбу под вакуумом и снова упаривали. При третьем упаривании оставляли в колбе ~200 мкл раствора, выпускали сухой воздух и добавляли 8 мг (30 мкмоль) *n*-толуолсульфонитротриазола из поллой пробки, которой закрывали колбу. Реакционную смесь выдерживали в течение 1 ч, затем за ходом реакции следили с помощью ТСХ в системе Б. По окончании реакции реакционную смесь или обрабатывали в условиях удаления цианэтильной защиты (см. общую методику), или упаривали со смесью толуол — спирт (1:1) до масла и удаляли диметокситритильную защиту (см. общую методику). Полученные таким образом нуклеотидные и нуклеозидные компоненты тетрануклеотидов объединяли и высушивали в вакууме с абсолютным пиридином так, как описано выше, добавляли 8 мг (30 мкмоль) *n*-толуолсульфонитротриазола, выдерживали 1 ч, получая полностью защищенный октануклеотид. Дальнейшее наращивание цепи олигодезоксирибонуклеотидов проводили аналогичным образом. По окончании синтеза целевого олигодезоксирибонуклеотида реакционную смесь обрабатывали 3–4 сут водным раствором аммиака при 20° С. Затем аммиак упаривали, остаток детритилировали 80% уксусной кислотой (1 мл) в течение 30 мин. Затем добавляли 3 мл 1% раствора иода в смеси пиридин — вода (7:3) для снятия тиометильной защитной группы и выдерживали в течение 30 мин. Под экстрагировали хлороформом, водный слой упаривали до масла, затем упаривали с аммиаком и анализировали ионообменной хроматографией в условиях, приведенных на рис. 2. Целевой олигодезоксинуклеотид выделяли ионообменной хроматографией на колонке (1×14 см) с аминохромом в градиенте концентрации  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0→0,3 М) в 7 М мочеvine (рН 6,8). Получали от 2 до 100 ОЕ<sub>260</sub> додека- или тетрадекадесоксирибонуклеотидов, что составляло 2–25% в расчете на исходный динуклеотид. После ионообменной хроматографии фракцию, соответствующую пику продукта, наносили на колонку (1×15 см) с биогелем Р-6, элюируя вещество 0,1 М раствором бикарбоната аммония в воде со скоростью 2,5 мл/ч. Первичная структура олигодезоксирибонуклеотидов была подтверждена модифицированным методом химических модификаций [19, 20].

Авторы благодарны Н. В. Амирханову, В. В. Гулевичу, С. И. Вершинной за участие в синтезе ди- и тринуклеотидных блоков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богачев В. С., Кумарев В. П. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 11, с. 1547–1555.
2. Кумарев В. П., Богачев В. С., Баранова Л. В., Кобзев В. Ф., Ривкин М. И., Рыбаков В. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1525–1534.
3. Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1516–1524.
4. Кумарев В. П., Ривкин М. И., Богачев В. С., Баранова Л. В., Меркулов В. М., Рыбаков В. Н., Солосов Е. И., Федоров В. И. Докл. АН СССР, 1980, т. 252, № 6, с. 1506–1510.

5. Kumarev V. P., Rivkin M. I., Bogachev V. S., Baranova L. V., Merkulov V. M., Rybakov V. N. FEBS Lett., 1980, v. 114, № 2, p. 273-277.
6. Гейдон Ю. З., Лисовская К. В., Дианов Г. Л., Баранова Л. В., Кумарев В. П., Салганик Р. И. Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология, 1984, т. 11, с. 32-36.
7. Меркулова Т. И., Соловьев В. В., Колчанов Н. А., Плисов С. Ю., Баранова Л. В., Меркулов В. М., Салганик Р. И. Биополимеры и клетка, 1986, т. 2, № 2, с. 93-101.
8. Хадсон Р. Ф. В кн.: Структура и механизм реакций фосфорорганических соединений. М.: Мир, 1967, с. 318.
9. Kabachnik M. I., Mastrukova T. A., Shipov A. E., Melentjeva T. A. Tetrahedron, 1960, v. 9, № 1, p. 10-15.
10. Chladek S., Nagyvary J. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 6, p. 2079.
11. Narang S. A., Bhanot O. S., Goodshield J., Wigtman R. H., Dheer S. K. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 17, p. 6183-6191.
12. Reese C. B., Titmas R. C., Jay L. Tetrahedron Lett., 1978, № 30, p. 2727-2730.
13. Лебедев А. В., Резвузин А. И. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 2, с. 149-185.
14. Stavinski I., Pozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353-357.
15. Coos A. F., Holman A. L., Nusbaum W. L. J. Amer. Chem. Soc., 1969, v. 91, p. 1522-1526.
16. Амирханов Н. В., Ривкин М. И., Кумарев В. П. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 1008-1010.
17. Shaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 23, p. 3821-3827.
18. Общий практикум по органической химии. М.: Мир, 1965, с. 605-629.
19. Maxam A., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 3, p. 560-564.
20. Рыбаков В. П., Ривкин М. И., Богачев В. С., Кумарев В. П. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1688-1689.

Поступила в редакцию  
13.II.1986

## THIOPHOSPHATE ANALOGUES OF NUCLEIC ACIDS. VI. THE SYNTHESIS AND PROPERTIES OF DEOXYNUCLEOTIDES CONTAINING 3'-PHOSPHOTHIOMETHYL GROUP FOR PHOSPHOTRIESTER SYNTHESIS OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDES

KUMAREV V. P., BARANOVA L. V., BOGACHEV V. S., LEBEDEV A. V.\*,  
OBUKHOVA L. V.

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

A modified phosphotriester method for synthesis of oligodeoxyribonucleotides has been developed. The method involves the synthesis of fully protected deoxynucleotides, 5'-dimethoxytrityl-N-acylnucleoside-3'-( $\beta$ -cyanoethyl)-3'-(S-methyl)thiophosphates, that are subsequently used for preparation of appropriate nucleoside and nucleotide components. The latter are utilized in a condensation reaction in pyridine in presence of usual condensing agents. The proposed method makes possible the synthesis of oligodeoxyribonucleotides in solution starting from mono-, di- and trimers and requires no chromatography at the intermediate stages. The yield of final products varies from 5 to 25%. The described method was applied for preparing oligodeoxynucleotide of 8-18 base-long that were subsequently used for enzymatic synthesis, cloning and expression of human angiotensin I gene and human fibroblast interferon gene fragment.