



УДК 517.113.4

## СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ С МОНО- И ДИФОСФОРИЛДИСУЛЬФИДНЫМИ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫМИ ГРУППИРОВКАМИ

© 2003 г. В. Г. Метелев\*\*, Е. А. Кубарева\*\*, Е. А. Романова\*\*, Т. С. Орецкая\*

\* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119992, Москва, Воробьевы горы;

\*\* НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию 29.11.2001 г. Принята к печати 21.01.2002 г.

Оптимизирован метод синтеза олигодезоксирибонуклеотидов с моно- и дифосфорилдисульфидными межнуклеотидными группировками. Направленное введение таких модификаций проведено с помощью дисульфидного обмена олигонуклеотид-3'-тиофосфатов с активированными 5'-дезоксис-5'-меркаптопроизводными или олигонуклеотид-5'-тиофосфатами как в присутствии, так и в отсутствие комплементарной матрицы. Установлено, что отсутствие матрицы по-разному сказывается на соотношении продуктов реакции (гомо- и гетеродимеров) в реакционной смеси. Замена одной фосфодиэфирной природной связи в 15–16-звенных ДНК-дуплексах на моно- или дифосфорилдисульфидную группировку вызывает незначительную термическую дестабилизацию соответствующего дуплекса. Изучена дисульфидная рекомбинация полученных соединений.

*Ключевые слова:* модифицированные олигонуклеотиды, тиолдисульфидный обмен, олигонуклеотид-3'-тиофосфаты, фосфорилдисульфидные группировки.

### ВВЕДЕНИЕ

Олигонуклеотиды с целенаправленно введенными атомами серы вместо кислорода нашли широкое применение при изучении структуры и функций нуклеиновых кислот, при исследовании специфических взаимодействий нуклеиновых кислот с белками, в антисенс-технологии [1–4]. Сера по сравнению с кислородом обладает большей нуклеофильностью, меньшей электроотрицательностью, является “мягким” атомом [5], предпочтительно координирует ионы некоторых тяжелых металлов. Растет интерес исследователей и к дисульфидсодержащим аналогам нуклеиновых кислот [6–9], которые, в первую очередь, были синтезированы для исследования третичной структуры и динамики конформационных перестроек биополимеров. Замена природной фосфодиэфирной группировки на монофосфорилдисульфидную (MPDS) или дифосфорилдисульфидную (DPDS) приводит к появлению нового электрофильного центра, который потенциально может участвовать в тиолдисульфидном обмене. Тиолдисульфидный обмен – это реакция тиола RSH с дисульфидом  $R^1-SS-R^2$ , в результате которой образуется

новый дисульфид  $R-SS-R^1$  и тиол  $R^2SH$ . Эта реакция эффективно протекает при комнатной температуре в воде при физиологических значениях рН [10]. Тиолдисульфидный обмен хорошо изучен в системах, где сера ковалентно соединена с алкильными или арильными остатками [10–12]. Свойства дисульфидов, в которых сера соединена ковалентно с иными, чем углерод, элементами, в частности с фосфором, исследованы в меньшей степени. Описан синтез олигонуклеотидов, содержащих DPDS- [7, 8] и MPDS-группировки [9]. В данной работе оптимизирован метод получения олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих единичные MPDS- и DPDS-группы, и проведено сравнительное изучение их физико-химических свойств.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Синтез олигодезоксирибонуклеотидов с моно- и дифосфорилдисульфидными связями*

Впервые лигирование нуклеозид-5'-тиофосфатов под действием  $K_3[Fe(CN)_6]$  до димеров, содержащих 5',5'-DPDS-группировку, было проведено Экштейном [13]. Эффективное лигирование гетерогенных по составу олигодезоксирибонуклеотидов с 3'- и 5'-концевыми тиофосфатами на комплементарной матрице с помощью окислителей ( $K_3[Fe(CN)_6]$  и  $KI_3$ ) проведено Грязновым и Летсингером [7]. В качестве окислителя может быть

Сокращения: MPDS и DPDS – моно- и дифосфорилдисульфидная группировки, ps, sp – 3'- и 5'-концевые тиофосфаты.

# Автор для переписки (тел.: (095) 939-54-07; факс: (095) 939-31-81; эл. почта: metelev@belozersky.msu.ru).

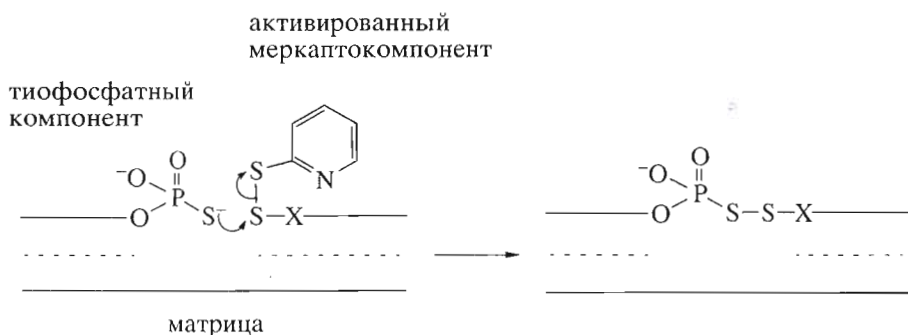


Схема.

также использована перекись водорода (0.03% раствор) как более удобный в работе и легко удаляемый реагент [8, 14]. Наши исследования показали, что при окислительном лигировании наряду с целевым гетеродимером  $R^1psspR^2$  образуются заметные количества гомодимеров  $R^1psspR^1$  и  $R^2psspR^2$ . Поэтому для получения соединений с DPDS-группами мы предложили использовать тиолдисульфидный обмен (схема,  $X = -P(O)(OH)O-$ ). В этом случае реагирующие функциональные группы находятся в разных олигонуклеотидах, и в результате лигирования должны образовываться исключительно гетеродимеры даже в отсутствие комплементарной матрицы [14]. Недавно с использованием аналогичного подхода нами впервые получены соединения с MPDS-группировками аутолигированием олигонуклеотид-3'-тиофосфата и активированного 2,2'-дипиридилдисульфидом 5'-дезоксипиридил-5'-меркапто-олигонуклеотида (схема,  $X = -CH_2-$ ) [9]. В целом, получение модифицированных таким образом олигодезоксирибонуклеотидов включает несколько стадий: а) синтез тиофосфатного и меркаптокомпонентов, б) активацию меркаптокомпонента 2,2'-дипиридилдисульфидом, в) лигирование, г) выделение целевых олигонуклеотидов. Стадии б-г были оптимизированы в данной работе при синтезе ряда олигодезоксирибонуклеотидов (табл. 1).

**Стадия а.** Введение в олигонуклеотиды концевых тиофосфатов с использованием 3*H*-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида и синтез 5'-дезоксипиридил-5'-меркаптоолигонуклеотидов с использованием 3'-*O*-(2-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламино)фосфи-

тов 5'-дезоксипиридил-5'-меркаптоолигонуклеотида или *N*<sup>4</sup>-бензоил-2',5'-дидезокси-5'-триметилтиотимидина проведены как описано ранее [9, 15]. При работе с меркаптосоединениями необходимо учитывать, что они легко подвергаются окислению кислородом воздуха в соответствующие дисульфиды, поэтому в нашей работе исходные компоненты были синтезированы непосредственно перед проведением тиолдисульфидного обмена либо получены восстановлением дитиотреитом образовавшихся при хранении дисульфидов.

**Стадия б.** При синтезе монофосфорилдисульфидных производных следует активировать 5'-меркапто-5'-дезоксипроизводные, так как они более склонны к окислению кислородом, чем олигонуклеотид-3'-тиофосфаты. В случае синтеза DPDS-производных удобнее получать (пиридил-2-тио)-производные того компонента, который лучше осаждается в стандартных условиях этиловым спиртом из 0.3 М раствора ацетата натрия (рН 5.5).

**Стадия в.** Лигирование тиофосфатного и активированного меркаптокомпонента может проходить как в присутствии, так и в отсутствие матрицы [8, 9, 14]. Для корректного сравнения результатов синтеза соединений с MPDS- и DPDS-группами нами был проведен синтез олигонуклеотидов (II)–(V) в обоих вариантах. Установлено, что отсутствие матрицы по-разному сказывается на соотношении продуктов реакции – гомо- и гетеродимеров – в реакционных смесях. MPDS-производные с высоким выходом получают даже в отсутствие матрицы. Как видно из рис. 1 (дорож-

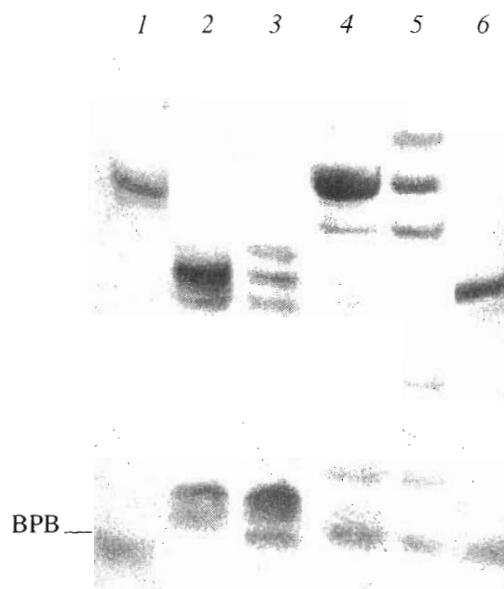
Таблица 1. Нуклеотидные последовательности (5'-3') модифицированных олигонуклеотидов

MPDS-олигонуклеотиды	DPDS-олигонуклеотиды
TCGGTTCpssCTGGCTCT (I)	-
TCGGTTCCpssTGGCTCT (II)	TCGGTTCCpsspTGGCTCT (III)
TCGGAAAGTpssTGA CTGCACGGT (IV)	TCGGAAAGTpsspTGA CTGCACGGT (V)
AGCCAACpssCTGGCTCT (VI)	-
AGCCAACCpssTGGCTCT (VII)	AGCCAACCpsspTGGCTCT (VIII)

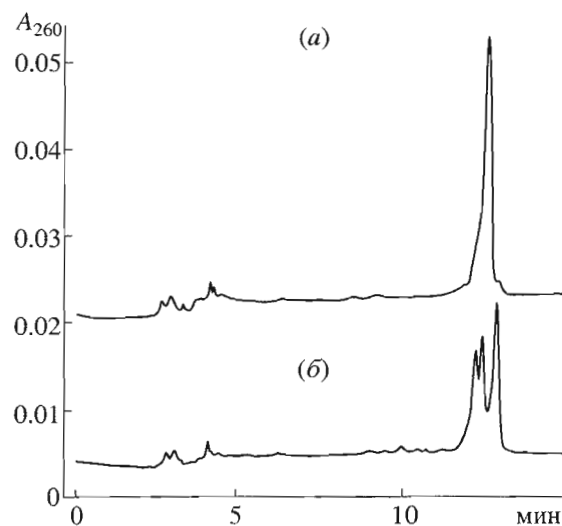
ки 2 и 4), основной продукт реакции – целевой гетеродимер. В случае DPDS-производных при лигировании в отсутствие матрицы образуется смесь двух гомодимеров и целевого гетеродимера (рис. 1, дорожки 3 и 5). По-видимому, накопление гомодимеров в реакционной смеси, не содержащей матричного олигонуклеотида, объясняется вторичным тиофосфорилдисульфидным обменом, когда свободный тиофосфорилированный олигонуклеотид реагирует с образовавшимся гетеродимером [14]. В присутствии матрицы основным продуктом реакции является гетеродимер (данные не приведены).

**Стадия г.** Так как выходы модифицированных соединений составляют 85–95%, во многих случаях применение ВЭЖХ или электрофореза в ПААГ для выделения целевых димеров из реакционных смесей не требуется, достаточно осаждения нуклеотидного материала этиловым спиртом. В тех случаях, когда стадия очистки все же необходима, следует учитывать, что линейные модифицированные олигонуклеотиды с DPDS-группировками, в отличие от MPDS-олигонуклеотидов, могут претерпевать постсинтетическую рекомбинацию в отсутствие матрицы. Так при анализе с помощью ион-парной ВЭЖХ электрофоретически гомогенных олигонуклеотидов (VII) и (VIII) (рис. 2) в первом случае на хроматограмме наблюдается один пик, соответствующий соединению (VII), а во втором – три пика, соответствующие гомодимерам и соединению (VIII). Аналогичные данные получены для олигонуклеотидов (II) и (III), (IV) и (V). После добавления матрицы к смеси гомодимеров, проведения “отжига” и инкубации в течение 16 ч при анализе смеси методом ВЭЖХ обнаруживается преимущественно целевой гетеродимер (данные не приведены). Этот факт впервые отмечен в работе [7]. Нами показано, что шпильчатые DPDS-олигонуклеотиды защищены от спонтанной рекомбинации [8, 14].

Полученные соединения (I)–(VIII) устойчивы при длительном (более 4 месяцев) хранении в виде замороженных растворов при –18°C, однако легко восстанавливаются до исходных компонентов дитиотреитом и трис(2-карбоксиэтил)фосфином. В стандартных условиях ферментативного 5'-фосфорилирования олигонуклеотидов, содержащих MPDS- и DPDS-группы, происходит существенное (иногда до 90–95%) расщепление S–S-связи, особенно в случае MPDS-производных, так как в используемых буферах присутствует дитиотреит и меркаптоэтанол. Несомненно, можно снизить степень распада изменением времени, температуры инкубации, добавлением комплементарной матрицы, однако для практического использования прямое “кинирование” неэффективно. Как видно из рис. 3, для получения меченых соединений приемлемым оказался их синтез по той же схеме с ис-



**Рис. 1.** Гель-электрофореграмма продуктов безматричного синтеза олигонуклеотидов: (II) – дорожка 2, (III) – дорожка 3, (IV) – дорожка 4, (V) – дорожка 5, в качестве контроля использованы олигодезоксирибонуклеотиды TCGGAAAGTTGACTGCACGGT – дорожка 1 и TCGGTTCTGGCTCT – 6.



**Рис. 2.** Ион-парная ВЭЖХ дисульфидсодержащих олигонуклеотидов (VII) – (a) и (VIII) (б), выделенных с помощью электрофореза в ПААГ.

пользованием 5'-<sup>32</sup>P-меченых тиофосфатных компонентов.

MPDS-производные, выделенные из реакционных смесей гель-электрофорезом, как показано выше, устойчивы в течение длительного промежутка времени. В то же время меченые [5'-<sup>32</sup>P]аналоги заметно деградируют с образованием исходных олигонуклеотидов, возможно, вследствие радиолитического распада, что обнаруживается по появлению до-



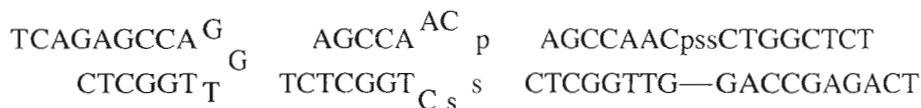


**Рис. 3.** Радиоавтограф гель-электрофореграммы продуктов реакции  $[5^{32}\text{P}]\text{TCCGAAAGTps}$  в присутствии матрицы  $\text{TGCAGTCAACTTTCCG}$  с (пиридил-2-тио)производными олигонуклеотидов  $s\text{TGACTGCACGGT}$  (2),  $sp\text{TGACTGCACGGT}$  (3),  $s\text{TGGCTCT}$  (4),  $sp\text{TGGCTCT}$  (5). Дорожка 1 – исходный  $[5^{32}\text{P}]\text{TCCGAAAGTps}$ .

полнительных (на уровне меченого тиофосфатного компонента и его димера) радиоактивных полос на электрофореграмме.

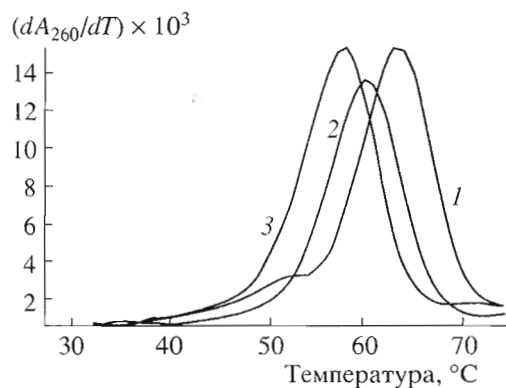
#### Термическая устойчивость дуплексов, содержащих дисульфидные связи

Дуплексы, полученные из олигонуклеотидов (I)–(VIII) и комплементарных матриц, предпола-



Вклад каждого плавления в общий процесс не оценивался.

Таким образом, нами оптимизирован метод синтеза олигодезоксирибонуклеотидов с единичными моно- и дифосфорилдисульфидными межнуклеотидными группировками. Направленное введение таких модификаций проведено с помощью дисульфидного обмена олигонуклеотид-3'-тиофосфатов с активированными 5'-дезокси-5'-меркапто-производными или олигонуклеотид-5'-тиофосфатами как в присутствии, так и в отсутствие



**Рис. 4.** Дифференциальные кривые плавления дуплексов (А)–(I), (Б)–(2), (В)–(3). Условия см. в “Эксперимент. части”.

гается использовать при изучении механизма действия ДНК-метилтрансферазы *SsoII* (*M.SsoII*), поэтому с помощью УФ-спектроскопии была охарактеризована их термическая устойчивость (табл. 2).

Для дуплексов (А)–(В) (рис. 4) и (Г)–(Е) характерно кооперативное плавление. Как видно из данных, приведенных в табл. 2, введение как DPDS-, так и MPDS-группы приводит к незначительной термической дестабилизации дуплекса. В то же время удивление вызвало довольно значительное повышение  $T_{\text{пл}}$  модифицированных дуплексов (З)–(К) по сравнению с немодифицированным дуплексом (Ж). Плавление дуплексов (Ж)–(К) сопровождалось широким температурным переходом и низким гиперхромным эффектом. Этот факт можно попытаться объяснить значительной самокомплементарностью обеих олигонуклеотидных цепей в этих дуплексах. Так, в случае дуплекса (К) общая кривая плавления, по-видимому, является суммарной кривой плавления матрицы  $\text{TCAGAGCCAGGTTGGCTC}$ , модифицированной цепи  $\text{AGCCAACpssCTGGCTCT}$  и самого дуплекса:

комплементарной матрицы. Изучена термическая устойчивость ДНК-дуплексов. Замена одной фосфодиэфирной природной связи в 15–16-звенных ДНК-дуплексах на моно- или дифосфорилдисульфидную группировку вызывает незначительную термическую дестабилизацию соответствующего дуплекса. В отличие от DPDS-соединений спонтанная дисульфидная рекомбинация MPDS-олигонуклеотидов до соответствующих дисульфидных гомодимеров нехарактерна.

Таблица 2. Термическая устойчивость олигодезоксирибонуклеотидных дуплексов

Название дуплекса	Нуклеотидная последовательность дуплекса 5' → 3' 3' ← 5'	Тип модификации	T <sub>пл</sub> дуплекса, ±0.5, °C
<b>А</b>	TCGGAAAGTTGACTGCACGGT GCCTTTC AACTGACGT	Нет	62.7
<b>Б</b>	TCGGAAAGT p s s p TGACTGCACGGT (V) GCCTTTC A—ACTGACGT	DPDS	59.9
<b>В</b>	TCGGAAAGT p s s TGACTGCACGGT (IV) GCCTTTC A—ACTGACGT	MPDS	58.3
<b>Г</b>	TCGGTTCCCTGGCTCT GAGCCAAGGACCGAGACT	Нет	62.4
<b>Д</b>	TCGGTTCC p s s p TGGCTCT (III) GAGCCAAGG—ACCGAGACT	DPDS	59.8
<b>Е</b>	TCGGTTCC p s s TGGCTCT (II) GAGCCAAGG—ACCGAGACT	MPDS	57.9
<b>Ж</b>	AGCCAACCTGGCTCT CTCGGTTGGACCGAGACT	Нет	62.4
<b>З</b>	AGCCAACC p s s p TGGCTCT (VIII) CTCGGTTGG—ACCGAGACT	DPDS	68.9
<b>И</b>	AGCCAACC p s s TGGCTCT (VII) CTCGGTTGG—ACCGAGACT	MPDS	69.2
<b>К</b>	AGCCAAC p s s CTGGCTCT (VI) CTCGGTTG—GACCGAGACT	MPDS	69.4
Матрица	3'CTCGGTTGGACCGAGACT5'	Нет	71.2

В дальнейшем нами предполагается исследовать возможность получения конъюгатов модифицированных олигонуклеотидов (олигонуклеотидных дуплексов) с тиолсодержащими соединениями, включая аминокислоты, пептиды, белки, за счет реакций дисульфидного обмена.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

В работе использовали 5'-*O*-диметокситритил-3'-(*N,N*-диизопропиламидо)-β-цианоэтилфосфиты 2'-дезоксирибонуклеозидов (Applied Biosystems, США); *N*-метилимидазол, трихлоруксусную кислоту (Fluka, Швейцария); тетразол (Pharmacia, Германия); 3*H*-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксид (Glen Research, США); 2,2'-дипиридилдисульфид (Sigma, США); дитиотреит (Serva, Германия); дигидрофосфат калия и гидроксид калия марки "ос. ч." (КНПО "Диагностикум", Россия), ацетонитрил марки "для жидкостной хроматографии" (Merck, Германия).

**Автоматический твердофазный синтез олигодезоксирибонуклеотидов** проводили амидофосфитным методом на синтезаторе Applied Biosys-

tems 380В (США) с использованием коммерческих реагентов и растворителей по стандартному регламенту. Концевые тиофосфаты вводили в олигонуклеотиды с использованием коммерческого реагента 5'-фосфат ON (Cruachem, США) или полимерного носителя, содержащего β-сульфоэтильную якорную группу, и 3*H*-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида как описано нами ранее [15].

**Синтез 5'-дезоксипентозин-5'-меркаптоолигонуклеотидов.** Олигонуклеотиды с концевым 5'-дезоксипентозин-5'-меркаптоонуклеозидом были синтезированы как описано в работе [9] с использованием 5'-дезоксипентозин-5'-триметилтиотимидин-3'-*O*-(2-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламидо)фосфита или *N*<sup>4</sup>-бензоил-2',5'-дидезокси-5'-триметилтиоцитидин-3'-*O*-(2-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламидо)фосфита в последней конденсации. Очистку 5'-триметилмеркаптоолигодезоксирибонуклеотидов проводили с помощью офВЭЖХ, используя гидрофобные свойства триметильной группы. Триметильные группы удаляли согласно методике работы [16] с некоторыми изменениями: к 3–5 ОЕ<sub>260</sub> 5'-дезоксипентозин-5'-триметилтиоолигонуклеотида в 100 мкл воды добавляли 3 мкл

0.3 М нитрата серебра, полученный раствор выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 20 мкл 0.1 М раствора дитиотреита, смесь перемешивали и через 5 мин центрифугировали в течение 10 мин. Выпавший осадок дважды промывали водой. Из объединенных растворов олигонуклеотиды выделяли осаждением спиртом или перхлоратом лития в ацетоне и последующим центрифугированием. Для предотвращения образования S-S-димеров в опытах использовали кипяченую в течение 30 мин воду, охлажденную в токе азота. Перед проведением реакций олигонуклеотиды проверяли на наличие в них возможных примесных S-S-димеров методом ВЭЖХ. Если содержание последних было заметным, то проводили дополнительную обработку олигонуклеотидного материала: к 15 нмоль олигонуклеотида в 100 мкл воды добавляли 25 мкл 100 мМ дитиотреита, 25 мкл 0.05 М Трис-НСl, pH 7.5, раствор выдерживали при комнатной температуре 40–50 мин, после чего добавляли 600 мкл 2% раствора перхлората лития в ацетоне и олигонуклеотидный материал осаждали центрифугированием.

**Синтез (пиридил-2-тио)производных олигодезоксирибонуклеотидов.** Соответствующие меркаптосоединения обрабатывали 0.03 М 2,2'-дипиридилдисульфидом в 2.5 мМ Трис-НСl, pH 8.0, с 50% DMF в течение 3 ч при комнатной температуре, затем добавляли 3 М ацетат натрия до 0.3 М концентрации и осаждали олигонуклеотидный материал добавлением 4–5-кратных объемов этилового спирта. К полученному активированному меркаптокомпоненту добавляли раствор тиофосфатного компонента и матрицы в 0.05 М морфолиноэтансульфокислоте (доведенной до pH 7.0 NaOH, содержащей 0.02 М MgCl<sub>2</sub>) в небольшом молярном избытке (1.1–1.2). Полученную смесь быстро нагревали до 50–60°C, далее медленно охлаждали и инкубировали 16 ч при 4–6°C. Олигонуклеотидный материал осаждали добавлением 2% перхлората лития в ацетоне с последующим центрифугированием и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ. Олигонуклеотидные полосы детектировали по поглощению в УФ-области спектра. Гели фотографировали с помощью системы Polaroid.

#### **Характеристика синтезированных соединений.**

Для экстракции олигонуклеотидов из геля использовали буфер, содержащий 0.3 М NaCl, 10 мМ Трис-НСl, pH 7.6, 1 мМ EDTA. Полученные соединения, которые соответствовали по электрофоретической подвижности целевым, дополнительно анализировали с помощью ВЭЖХ в ион-парном варианте на хроматографе Waters (США) в следующих условиях: колонка 4 × 250 мм, сорбент Диасорб С<sub>16</sub>T (размер частиц 7 мкм), температура колонки 45°C, элюент – 48 мМ калий-фосфатный

буфер (pH 7.0), содержащий 2 мМ тетрабутиламоний дигидрофосфат, с логарифмическим градиентом концентрации ацетонитрила 5–40% [17], расход элюента 1 мл в мин. Расщепление монофосфорилдисульфидных связей, т.е. превращение олигонуклеотидного димера в исходные олигонуклеотиды, проводили действием 0.05 М дитиотреита (1 ч, 20°C). Продукты расщепления анализировали ион-парной ВЭЖХ.

**Зависимость оптического поглощения олигонуклеотидных дуплексов от температуры** в буфере, содержащем 0.2 М NaCl, 0.01 М Трис-НСl, pH 7.0, регистрировали на спектрофотометре "Cary 50 Bio", оснащенном контроллером температуры; температуру в интервале 25–85°C повышали непрерывно со скоростью 0.5 град/мин. Концентрация олигонуклеотидов (0.1 мМ в расчете на мономерное звено) определялась спектрофотометрически.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 01-04-48605), Российской государственной программы "Ведущие научные школы" (грант № 00-15-97944) и программы "Университеты России – фундаментальные исследования" (грант № 05.03.010).

Авторы выражают благодарность Е.М. Волкову за синтез защищенных 5'-дезоксидеокси-5'-тримитилтионуклеозидфосфитов и В.Н. Ташлицкому (МГУ, Москва) за анализ реакционных смесей ион-парной ВЭЖХ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamm M.L., Piccirilli J.A. // J. Org. Chem. 1997. V. 62. P. 3415–3420.
2. Zon G., Stec W.J. // Oligonucleotides and Analogs. A Practical Approach / Ed. F. Eckstein. Oxford; New York; Tokyo: IRL Press, 1991. P. 87–108.
3. Verma S., Eckstein F. // Ann. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 99–134.
4. Methods in Molecular Medicine. Antisense Therapeutics / Ed. S. Agrawal. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 1996.
5. Pearson R.G. // Science. 1966. V. 151. P. 172–177.
6. Долинная Н.Г., Борисова О.А. // Молекулярн. биология. 2000. Т. 34. С. 931–945.
7. Gryaznov S., Letsinger R.L. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 1403–1408.
8. Dolinnaya N., MeteleV V., Oretskaya T., Tabatadze D., Shabarova Z.A. // FEBS Lett. 1999. V. 444. P. 285–290.
9. MeteleV V.G., Borisova O.A., Volkov E.M., Oretskaya T.S., Dolinnaya N.G. // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. P. 4062–4069.
10. Singh R., Whitesides G.M. // Chemistry of Sulphur-containing Functional Groups / Eds S. Patai, Z. Rappoport. N.Y.: John Wiley & Sons Ltd., 1993. P. 634–658.

11. Gilbert H.F. // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1990. V. 63. P. 69–172.
12. Raines R.T. // *Nature Structural Biology.* 1997. V. 4. P. 424–427.
13. Eckstein F. // *J. Am. Chem. Soc.* 1966. V. 88. P. 4292–4294.
14. Долинная Н.Г., Метелев В.Г. // *Биоорган. химия.* 2000. Т. 26. С. 306–314.
15. Метелев В.Г., Орецкая Т.С. // *Биоорган. химия.* 1999. V. 25. P. 490–494.
16. Sinha N.D., Striepeke S. // *Oligonucleotides and Analogs. A Practical Approach* / Ed. F. Eckstein. Oxford; New York; Tokyo: IRL Press, 1991. P. 185–210.
17. Таулицкий В.Н., Орецкая Т.С. // *Биоорган. химия.* 1997. Т. 23. С. 732–741.

## The Synthesis and Properties of Oligodeoxyribonucleotides with Single Mono- and Diphosphoryldithio Internucleotide Links

V. G. Metelev\*#, E. A. Kubareva\*\*, E. A. Romanova\*\*, and T. S. Oretskaya\*

# Phone: +7 (095) 939-5407, fax: +7 (095) 939-3181, e-mail: metelev@belozersky.msu.ru

\* Moscow State University, Chemical Faculty, Vorob'evy gory, GSP-3 Moscow, 119899 Russia

\*\* Belozersky Institute of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, Vorob'evy gory, GSP-3 Moscow, 119899 Russia

The synthesis of oligodeoxyribonucleotides bearing mono- and diphosphoryldisulfide internucleotide links was optimized. Oligonucleotide 3'-thiophosphorothioates were modified using the thiophosphoryl–disulfide exchange with preactivated 5'-deoxy-5'-mercaptoligonucleotides or 5'-phosphorothioate derivatives both with and without a complementary template. The lack of template was shown to differently affect the product ratio (homo- and heterodimers) in the reactions of mono- and diphosphoryldisulfide-containing oligonucleotides. A replacement of one natural phosphodiester bond in 15–16-mer duplexes by a mono- or diphosphoryldisulfide group causes a slight thermal destabilization of the corresponding duplex. The disulfide recombination of the resulting compounds was studied. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* modified oligonucleotides, oligonucleotide 3'-thiophosphorothioates, phosphoryldisulfide links, thioldisulfide exchange