



УДК 547.963:32.04

**СЕЛЕКТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ МОНОЗАМЕЩЕННЫХ
ФОСФАТНЫХ ГРУПП В 5'-МОНО- И ПОЛИФОСФАТАХ НУКЛЕОЗИДОВ
И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ***Мишенина Г. Ф.**Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР**Самуков В. В., Шубина Т. Н.**Специальное конструкторско-технологическое бюро
биологически активных веществ, Новосибирск*

Предложен метод синтеза 5'-фосфамидов моно- и полифосфатов нуклеозидов и олигонуклеотидов, заключающийся в обработке смеси амина и нуклеозид- или олигонуклеотид-5'-моно- или полифосфата в органическом растворителе (диметилформамид, пиридин, диметилсульфоксид) избытком конденсирующего агента — смеси трифенилфосфида и 2,2'-дипиридилдисульфида в течение 1–4 ч при 20°. Реакция отличается высокой избирательностью и приводит к количественному амидированию монозамещенных фосфатных групп. Показано, что двузамещенные фосфаты (диэфиры, амидоэфиры и др.) не реагируют с конденсирующим агентом в условиях синтеза. При увеличении избытка конденсирующего агента синтез можно проводить в органическом растворителе, содержащем до 15% воды.

Синтез производных олигонуклеотидов и нуклеозид-5'-полифосфатов по монозамещенной фосфатной группе представляет большой интерес. Такие производные, например амиды нуклеозид-5'-моно- и полифосфатов, широко применяются как субстратные аналоги или ингибиторы для изучения ферментных реакций [1–3]. Амиды олигонуклеотидов и нуклеозид-полифосфатов могут оказаться полезными в синтезе сорбентов аффинной хроматографии [4]. Кроме того, 5'-фосфамиды олигонуклеотидов используются для исследования матричных реакций, например комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот [5].

Как правило, синтез таких производных нуклеотидов заключается в активации фосфатной группы и реакции активированного фосфата с нуклеофильным реагентом (спиртом, амином, фосфатом и т. п.) [6, 7]. Лучшие результаты при этом достигаются в том случае, если фосфорилируемый субстрат обладает высокой нуклеофильностью, что позволяет исключить возможность побочных реакций активированного первичного фосфата с другими нуклеофилами, находящимися в среде. Легче всего фосфорилируются дианионы фосфорных кислот, а также первичные и вторичные алифатические амины.

Конденсирующий агент, используемый для активации монозамещенных фосфатных групп в олигонуклеотидах и нуклеозид-5'-полифосфатах в синтезе фосфамидов, должен удовлетворять весьма жестким требованиям: не реагировать с межнуклеотидными фосфатами, гетероциклическими

основаниями, оксигруппами углеводных остатков; не реагировать с амином с заметной скоростью, так как для получения высоких выходов целевого продукта важно проводить активацию концевой 5'-фосфата в присутствии нуклеофильного субстрата — амина; реакцию необходимо проводить в очень мягких условиях с учетом свойств фосфорилирующих соединений.

Известно, что многие конденсирующие и электрофильные агенты проявляют заметную избирательность в реакциях с монозамещенными фосфатами в олигонуклеотидах и нуклеозид-5'-полифосфатах. Тем не менее ни один из описанных конденсирующих реагентов, применявшихся ранее для синтеза фосфамидов олигонуклеотидов [5, 6, 8–10], не является полностью специфичным по отношению к фосфомоноэфирным группам. Кроме того, все эти реагенты с большой скоростью реагируют с аминами.

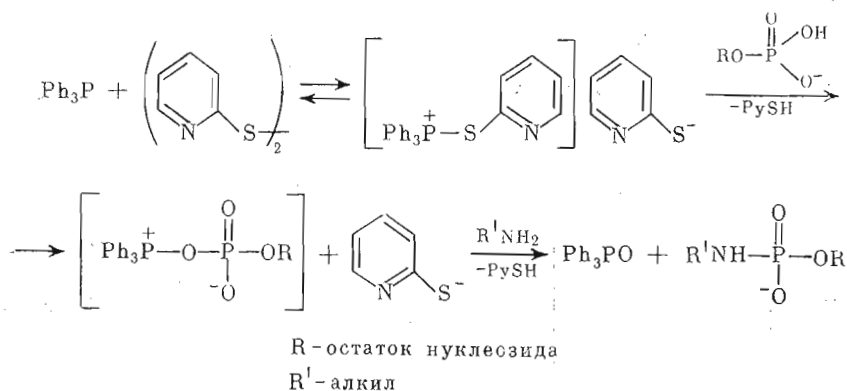
Цель настоящей работы — поиск высокоспецифичного реагента для синтеза фосфамидов олигонуклеотидов и нуклеозид-5'-полифосфатов, удовлетворяющего перечисленным выше требованиям.

Исследование активации моно- и динуклеотидов под действием окислительно-восстановительного реагента — смеси трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида ($\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$) — методом ^{31}P -ЯМР показало, что эта реакция весьма чувствительна к влиянию сильноосновных аминов [11]. Так, активация рdT(Ас) под действием $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ в пиридине протекает через ту же последовательность, что и при применении арилсульфохлоридов [12]. Добавление триэтиламина останавливает реакцию на стадии симметричного пиродифосфата, диэфиры и амидоэфиры фосфорной кислоты не реагируют вообще. В других растворителях (ацетонитрил, диметилформамид, диметилсульфоксид) бис-замещенные фосфаты также инертны к действию $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$.

В присутствии таких высоконуклеофильных субстратов, как алифатические амины, активация монозамещенных фосфатных групп с помощью $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ приводит к количественному образованию соответствующих фосфамидов.

Синтез амидов 5'-моно- и полифосфатов нуклеозидов и олигонуклеотидов по концевой фосфатной группе изображен на схеме 1 [13].

Схема 1



При использовании 5–10-кратного избытка амина и 2,5–5-кратного избытка $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ на каждую монозамещенную фосфатную группу реакция заканчивается в течение 1–2 ч. Продукт реакции выделяется просто выливанием реакционной смеси в эфир, отделением и промыванием осадка. Выходы превышают 80%, и амиды, как правило, не требуют дальнейшей очистки хроматографией. Натриевые соли 5'-фосфамидов легко получают осаждением из реакционной смеси раствором NaClO_4 в ацетоне (табл. 1, 2).

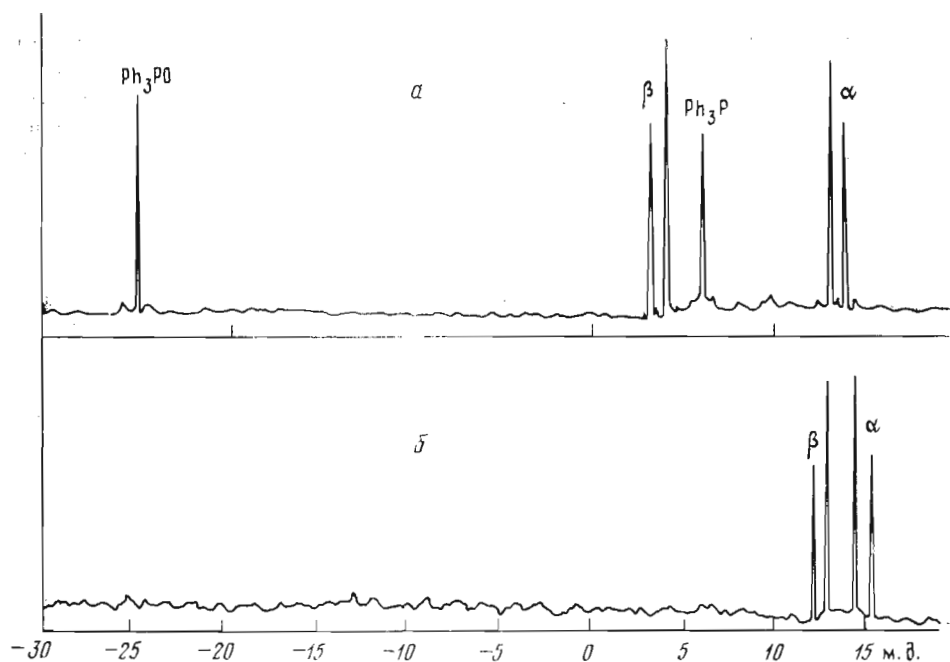


Рис. 1. Спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси при синтезе β -морфолида UDP с помощью $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ в DMFA (а) в сравнении со спектром исходной триэтиламмониевой соли UDP в DMFA (б)

В наших экспериментах не отмечено сколько-нибудь заметной реакции $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ с аминами и гетероциклическими основаниями нуклеотидов, что согласуется с литературными данными [14, 15]. При использовании $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ для синтеза межнуклеотидной связи (10 экз. реагента, 48 ч) наблюдалась побочная реакция замещения свободных оксигрупп в углеводных остатках на 2-тиопиридиновые (до 5%) [16], однако в примененных нами условиях синтеза фосфамидов эта реакция практически не идет.

Особый интерес представляет активация конечного фосфата при синтезе фосфамидов 5'-полифосфатов нуклеозидов и олигонуклеотидов. 5'-Дифосфаты нуклеозидов и олигонуклеотидов реагируют в присутствии

Таблица 1

Характеристика синтезированных 5'-фосфамидов моно- и олигонуклеотидов

Фосфат	Амин	Растворитель	Выход, %	Гомогенность по данным ТСХ, %	R_f (система)
pdT	Пиперидин	DMFA	92	100	0,82 (Б)
pdT	Морфолин	DMSO	90	100	0,81 (Б)
pU	Бензиламин	Пиридин	80	100	0,52 (А)
pA	»	DMFA	91	98	0,45 (А)
pdT	$\text{ClRCH}_2\text{NHCH}_3^*$	Пиридин	88	100	0,77 (Б)
(pdT) ₃	Пиперидин	»	88	96	0,75 (Б)
(pdT) ₂	Бензиламин	»	100	100	0,33 (А)
(pdT) ₃	$\text{ClRCH}_2\text{NHCH}_3^{**}$	DMFA	83	97	0,65 (Б)

* $\text{ClR}=\text{ClC}_2\text{H}_4(\text{CH}_3)\text{N}-\langle \text{ring} \rangle$. Отношение $\text{pdT}-\text{ClRCH}_2\text{NHCH}_3-\text{Cl}$ (ковалентный) = 1:0,97:0,95.

** Отношение $(\text{pdT})_3-\text{ClRCH}_2\text{NHCH}_3=1:1,02$.

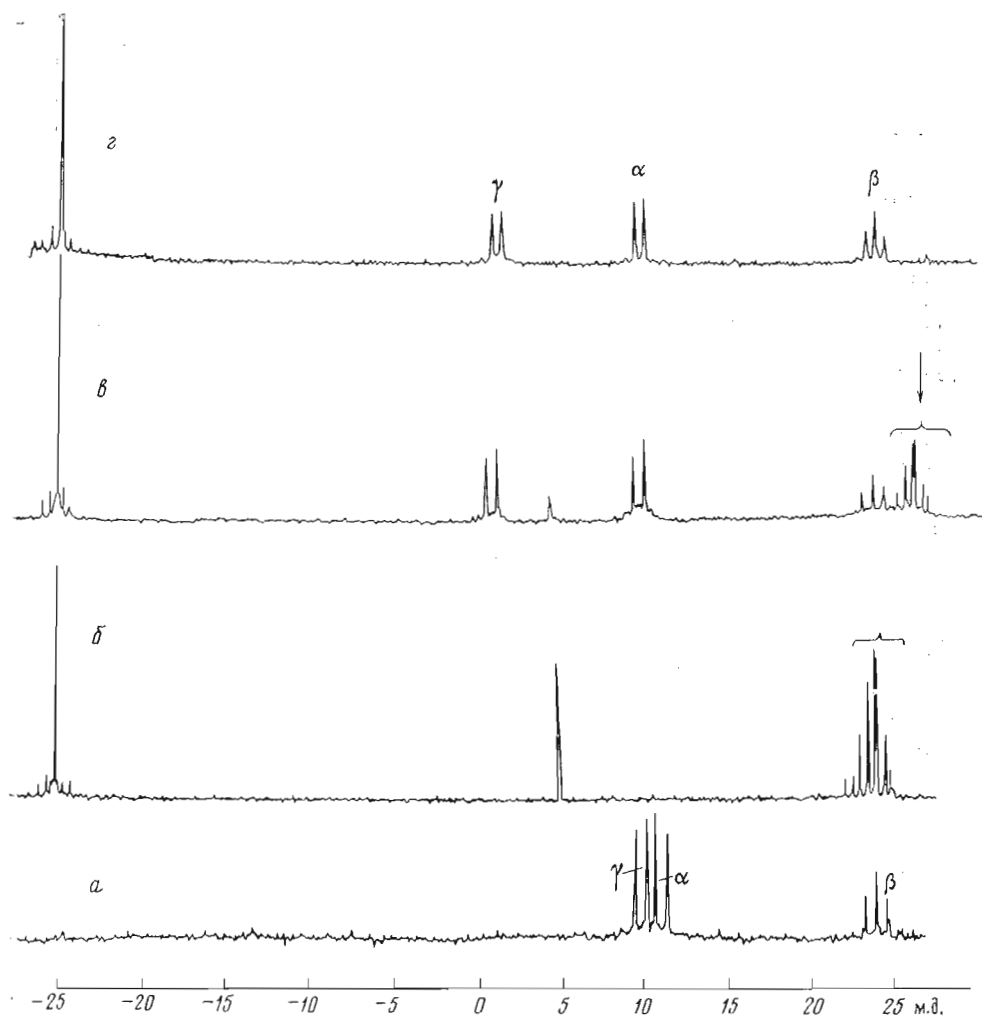


Рис. 2. Спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси при синтезе γ -бензиламида АТФ: *а* — триэтиламмониевая соль АТФ+0,4 М бензиламин в DMFA; *б*, *в*, *г* — соответственно через 3, 20 мин и 4 ч после добавления 3 экв. $\text{Rh}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$. Стрелкой указаны сигналы, отвечающие триметафосфату

амина с $\text{Rh}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ аналогично 5'-монофосфатам, образуя соответствующие β -амиды. Профосфатная связь при этом полностью сохраняется (рис. 1). При активации аденозин-5'-трифосфата с помощью $\text{Rh}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ в диметилформамиде в присутствии амина можно было ожидать, что реакция пойдет по схеме, приведенной выше, минуя образование триметафосфата [17]. Однако в спектре ^{31}P -ЯМР в первые же минуты наблюдается количественное образование триметафосфата (рис. 2б), который затем в течение 3—4 ч реагирует с амином с образованием γ -амида. При добавлении метанола или воды к реакционной смеси в момент образования триметафосфата его аминолиз резко ускоряется и заканчивается за 15—20 мин. Поэтому целесообразно проводить синтез γ -амидов взаимодействием нуклеозид-5'-трифосфатов с $\text{Rh}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ и амином в водном диметилформамиде либо предварительно активировать трифосфат, затем добавлять водный или метанольный раствор амина [17].

Столь высокая специфичность $\text{Rh}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ особенно важна для синтеза 5'-фосфамидов рибоолигонуклеотидов, где любая активация диэфирного фосфата приводит к образованию циклических фосфотриэфиров, ко-

Характеристика β- и γ-амидов 5'-полифосфатов нуклеозидов и олигонуклеотидов (растворитель DMFA)

5'-ди- или трифосфат	Амин	Выход, %	Гомогенность по данным БХ или ЯМР, %	R _f в системе В
ppU	Морфолин	90	100	0,65
ppTpTpT*	»	82	95	0,24
ppU	C ₁ RCH ₂ NHCH ₃	92	> 95	0,60
pppA	C ₆ H ₅ CH ₂ NH	85	100	—
pppA**	NH ₃	100	100	—

* Растворитель DMSO.

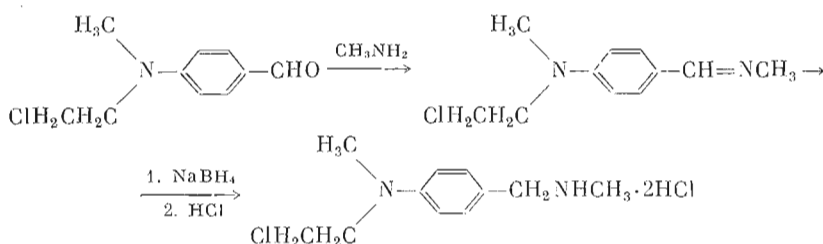
** К раствору 0,05 ммоль аденозин-5'-триметафосфата в 1 мл DMFA добавлено 0,1 мл конц. водного NH₃.

торые могут гидролизываться с разрывом или изомеризацией межнуклеотидной связи [9]. При обработке раствора цетавлоновой соли полиуридилевой кислоты, содержащей в среднем 100 мономерных звеньев, в диметилформамиде большими избытками морфолина и Ph₃P—(PyS)₂ в спектре ³¹P-ЯМР в течение нескольких часов не обнаружено каких-либо изменений, указывающих на образование циклических триэфиров (рис. 3). После осаждения из реакционной смеси натриевой соли poly(U) ее УФ-спектр и профиль гель-фильтрации на сефадексе G-100 оказались практически идентичными таковым для контрольного образца.

Нами показано, что в условиях синтеза 5'-фосфамидов олигонуклеотидов и нуклеозид-5'-полифосфатов, содержащих алкилирующую β-хлорэтиламиногруппу, ковалентный хлор полностью сохраняется (см. табл. 1). Эту реакцию можно проводить при пониженной температуре (0–5°) без увеличения длительности реакционного периода. Выходы и чистота продуктов при этом близки к таковым для 5'-фосфамидов, представленных в табл. 1 и не содержащих алкилирующей функции.

Следует отметить, что в качестве алкилирующего амина нами был использован 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилметиламин, отличающийся от амина, описанного ранее в работе [18] (схема 2).

Схема 2



Разработанный вариант синтеза алкилирующего амина весьма прост и позволяет ввести радиоактивную метку, если использовать [¹⁴C]метиламин или NaB³H₄.

Проведение реакций в безводных органических растворителях вызывает необходимость перевода олигонуклеотидов в соответствующую растворимую соль, что связано с неудобствами при большой длине олигонуклеотида и особенно при малом его количестве. В предварительных экспериментах по синтезу 5'-амидов pdT и (pdT)₃ нами обнаружено, что даже при содержании воды в реакционной смеси 10–15% по объему можно достичь практически количественного превращения первичной фосфатной группы в фосфамидную, если использовать достаточно большой избыток.

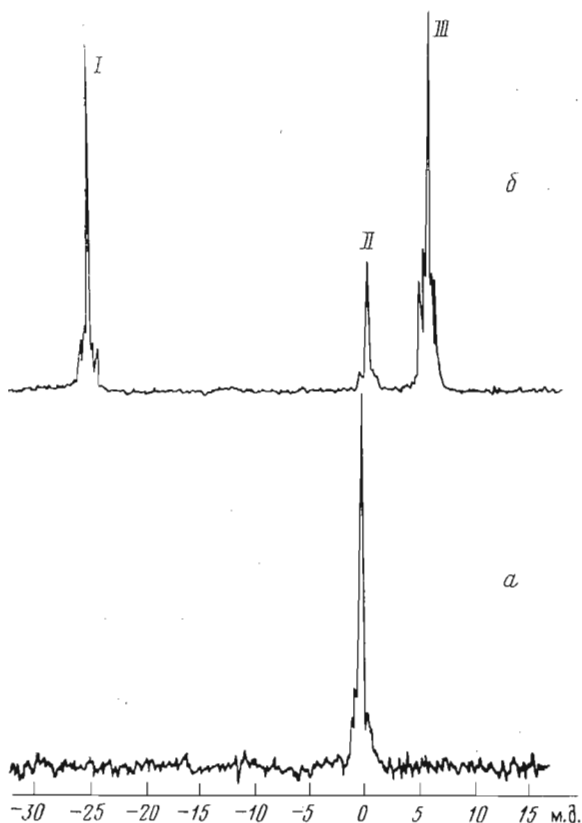


Рис. 3. Спектр ^{31}P -ЯМР $\text{poly}(\text{U})$ в DMFA (а) и реакционной смеси через 2 ч после обработки бензиламином и $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ (б): I — Ph_3PO , II — $\text{poly}(\text{U})$, III — Ph_3P

конденсирующего агента (10—100-кратный). Наидешные условия позволяют вводить в реакцию 0,1—10 ОЕ олигонуклеотида в той ионной форме, в которой он имеется, поскольку натриевые и триэтиламмониные соли олигонуклеотидов, даже весьма длинных, достаточно хорошо растворимы в диметилформамиде, содержащем 10—15% воды.

Так, суммарные $[^{14}\text{C}]$ гексарибонуклеотиды в количестве 1—5 ОЕ₂₆₀, выделенные после гидролиза $[^{14}\text{C}]$ РНК рибонуклеазой из *Serratia marcescens*, были превращены в соответствующие 4-(N-метил-N-β-хлорэтиламино)бензилметиламиды с выходом 95% по радиоактивности и УФ-поглощению. По данным микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе, препарат не содержал исходных гексарибонуклеотидов и продуктов их деградации. Содержание активного хлора, определенное по алкилированию этилендиамина [19], было не менее 80%.

Изложенный материал демонстрирует высокую селективность реагента окислительно-восстановительной конденсации $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ по отношению к монозамещенной фосфатной группе в присутствии достаточно основных аминов ($\text{p}K_a > 5$).

Предлагаемый нами метод синтеза фосфамидов открывает возможности для получения амидов 5'-ди- и трифосфатов нуклеозидов, в том числе алкилирующих, представляющих интерес для аффинной модификации ферментов, реагентов для комплементарно адресованной модификации нуклеиновых кислот, различных нуклеотидных и олигонуклеотидных производных для иммобилизации на CNBr-сефарозе и других носителях, а также β- и γ- $[^{32}\text{P}]$ меченых нуклеозид-5'-ди- и трифосфатов.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеотиды производства СКТВ БАВ Главмикробиопрома (Новосибирск). Олигонуклеотиды получали по методике работы [20], ионообменную хроматографию проводили на целлюлозе DE-52 (Whatman, Англия). Трифенилфосфин — препарат фирмы Chemapol (ЧССР), 2,2'-дипиридилдисульфид — препарат фирмы Merck (ФРГ). 4-N-Метил-N-(2-хлорэтил)аминобензальдегид синтезировали по [21]. В работе использовали сухие растворители (пиридин, диметилформамид, диметилсульфоксид) с содержанием влаги не более 0,02%. Все жидкие амины очищали перегонкой над твердым КОН и хранили в темноте. Температуры плавления определяли на столике Кофлера. Цетавлоновая соль poly(U) (80—120 нуклеотидов) получена В. К. Райтом (НГУ). Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках с SiO₂ DC-Alufolien Kieselgel 60F 254 (Merck, ФРГ) в системах CH₃CN—H₂O, 4:1 (А) и *i*-C₃H₇OH—(C₂H₅)₃N—H₂O, 7:1:2 (Б); хроматографию на бумаге — в системе этанол—1 М ацетат аммония, 7:3 (рН 7,5) (В).

Спектры ³¹P-ЯМР записывали на импульсном ЯМР-спектрометре WP-80 DS (Bruker-Physik, ФРГ) в ампулах диаметром 10 мм с H₃PO₄ в качестве внешнего стандарта. При записи спектров и отнесении сигналов применяли гетероядерное подавление спин-спиновой связи.

Потенциометрическое титрование ионов хлора проводили на полуавтоматической установке, состоящей из магнитной мешалки, хлор-серебряного электрода, электрода сравнения, микрошприца с электроприводом, рН-метра рН-673 и самописца Perkin-Elmer. Для определения ионного хлора к аликвоте препарата добавляли 0,5 мл 20% HNO₃ в метаноле и титровали 0,0116 н. AgNO₃. Для определения общего хлора к аликвоте добавляли 0,5 мл 1 М NaOH в воде и выдерживали 30 мин при 90—95°, затем приливали 0,5 мл HNO₃ в метаноле и титровали, как описано выше.

Общий метод синтеза 5'-амидов моно- и олигонуклеотидов. К раствору 0,02 ммоль триалкиламмониевой соли моно- или олигонуклеотида и 0,08—0,15 ммоль амина в 0,2 мл диметилформамида (пиридина, диметилсульфоксида) добавляли 0,06—0,10 ммоль трифенилфосфина и 0,06—0,10 ммоль 2,2'-дипиридилдисульфида. Смесь выдерживали 1—2 ч при 20°. Синтез алкилирующих 5'-фосфамидов проводили при 5° в течение 1—2 ч. Затем реакционную смесь по каплям добавляли к 5—10 мл сухого эфира. Осадок отделяли, промывали эфиром (3×3 мл) и высушивали в вакууме. Синтезированные соединения (табл. 1) в виде натриевых солей были также охарактеризованы УФ-спектрами при рН 2 и 8. Алкилирующие 5'-моно- и олигонуклеотиды охарактеризованы содержанием ковалентного хлора. Натриевые соли (для анализа) получали добавлением реакционной смеси или раствора полученного амида в 0,2 мл метанола к 3 мл 1—2% раствора NaClO₄ в сухом ацетоне, осадок промывали ацетоном (2×2 мл) и эфиром (1×2 мл) и высушивали в вакууме.

Для синтеза алкилирующих амидов олигонуклеотидов использовали алкилирующий амин в виде основания. При этом к раствору дихлоргидрата амина в метаноле (0,5 мл) добавляли 2—3-кратный молярный избыток мелко растертого K₂CO₃ или 10% раствора аммиака в метаноле при охлаждении льдом. Смесь разбавляли до 5 мл диоксаном, осадок неорганической соли отделяли, раствор упаривали в вакууме на холоду. Выход основания 90—95%.

Общий метод синтеза β- и γ-амидов 5'-полифосфатов нуклеозидов и олигонуклеотидов. К раствору 0,02 ммоль триалкиламмониевой соли 5'-полифосфата нуклеозида или олигонуклеотида и 0,1 ммоль амина в диметилсульфоксиде или диметилформамиде (0,5 мл) добавляли 0,06 ммоль Ph₃P и 0,06 ммоль (PyS)₂ и выдерживали 3—4 ч при 25°. При осаждении реакционной смеси в 10 мл 1—2% раствора NaClO₄ в ацетоне в осадок выпадает практически чистая натриевая соль соответствующего амида (табл. 2).

γ -Амиды АТР. К раствору 0,02 ммоль триэтиламмониевой соли АТР в диметилсульфоксиде или диметилформамиде (0,5 мл) добавляли 0,06 ммоль Ph_3P и 0,06 ммоль $(\text{PyS})_2$. Через 30 мин (25°) добавляли к смеси раствор 0,2–0,3 ммоль амина в метаноле или воде (0,5 мл) и выдерживали 30 мин. После отгонки из смеси воды или метанола в вакууме γ -амид выделяли, как описано выше.

Взаимодействие poly(U) с Ph_3P – $(\text{PyS})_2$ и бензиламином. Раствор цетавлоновой соли poly(U) в 1 мл диметилформамида (20 мкмоль нуклеотидов/мл) вносили в ампулу ЯМР-спектрометра. После добавления 400 мкмоль бензиламина записывали спектр ^{31}P -ЯМР (рис. 3). Затем добавляли 150 мкмоль трифенилфосфина и 150 мкмоль дициридиндисульфида. Через 20 ч записывали второй спектр (рис. 3). Содержание ампулы добавляли к 10 мл 2% раствора NaClO_4 в ацетоне, осадок отделяли, многократно промывали ацетоном, высушивали в вакууме и растворяли в воде (23 OE_{265} /мл). Контрольный образец poly(U) был приготовлен из цетавлоновой соли poly(U) осаждением в ацетоновый раствор NaClO_4 аналогичным образом. УФ-спектры обоих препаратов были идентичны $\lambda_{\text{макс}}^{\text{рН}6,5}$ 263 нм). Раствор poly(U) (0,3 мл), подвергнутой обработке Ph_3P – $(\text{PyS})_2$ и амином, нанесли на колонку (15×0,9 см) с сефадексом G-100, уравновешенную водой. Элюцию проводили водой со скоростью 3 мл/ч. Гель-фильтрация 0,3 мл раствора контрольного образца проводилась на этой же колонке в аналогичных условиях. Профили гель-фильтрации имеют сходный вид, положения максимумов D_{254} совпадают, содержание фракции с относительно низким молекулярным весом (последняя треть объема элюата, имеющего регистрируемую оптическую плотность) одинаково для обоих образцов poly(U).

4-[N-Метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензильденметиламин. К 5 ммоль 4-N-метил-N-(2-хлорэтил)аминобензальдегида (1,0 г) добавляли 3 мл 10% раствора метиламина в метаноле и перемешивали до образования прозрачного раствора. Метанол отгоняли в вакууме, остаток перекристаллизовывали из *n*-гексана. Выход 770 мг (72%). Т. пл. 54–55°.

4-[N-Метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилметиламин, дихлоргидрат. К раствору 1,5 г (7,1 ммоль) 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензильденметиламина в 10 мл холодного метанола добавляли 0,4 г NaBH_4 и встряхивали до растворения. Реакционную смесь оставляли на 20 мин при 20° , затем при охлаждении осторожно добавляли избыток HCl в метаноле. После окончания выделения водорода раствор охлаждали до 0° и отделяли осадок NaCl фильтрованием. Фильтрат упаривали, к остатку добавляли метанол с каплей HCl и снова упаривали. Эту процедуру повторяли 3–4 раза (до полного удаления H_3BO_3). Концентрированный метанольный раствор разбавляли тремя объемами эфира. Соль амина выпадает в виде мелкокристаллического белого осадка. Выход 1,82 г. (93%). Т. пл. 151–152° (расплавается при 136–137°). Найдено, %: Cl (ионный) 25,4; Cl (ковалентный) 12,2. $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{Cl} \cdot 2\text{HCl}$. Вычислено, %: Cl (ионный) 24,9; Cl (ковалентный) 12,5.

4-(N-метил-N- β -хлорэтиламино)бензилметиламиды [^{14}C]гексарибонуклеотидов. Раствор 1 OE_{260} триэтиламмониевой соли [^{14}C]гексарибонуклеотидов ($\sim 10^8$ имп/мин) в 5 мкл воды добавляли к раствору основания амина, полученного из 1,5 мг дихлоргидрата, в 25 мкл диметилформамида. К смеси прибавляли по 10 мкл 1 М растворов Ph_3P и $(\text{PyS})_2$ в диметилформамиде, выдерживали 50 мин при 1° и снова добавляли по 10 мкл растворов Ph_3P и $(\text{PyS})_2$. Через 60 мин при 1° смесь переносили в 100 мкл абс. метанола, к раствору добавляли 1 мл ацетона, содержащего 1 мг NaClO_4 , и выдерживали на холоду 15 мин. Продукт в виде натриевой соли отделяли центрифугированием при 5000 об/мин (0°) в течение 10 мин, трижды промывали холодным ацетоном, высушивали в вакууме и растворяли в 100 мкл воды. Выход 95% по радиоактивности и оптической плотности, степень превращения в амид более 95% по данным микроколоч-

пой хроматографии. Содержание активного хлора, определенное по алкилированию этилендиамина [19], не более 80%.

Авторы благодарят чл.-кор. АН СССР Д. Г. Кнорре за постоянное внимание и интерес к работе, а также студента НГУ Б. П. Соколова за выполнение эксперимента по синтезу алкилирующих производных из суммарных [^{14}C]гексарибонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ankilova V. N., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I. (1975) FEBS Lett., 60, 172-175.
2. Ахвердян В. З., Киселев Л. Л., Кнорре Д. Г., Лаврик О. И., Невнянский Г. Г. (1976) Докл. АН СССР, 226, 698-701.
3. Grachev M. A., Zaichikov E. F. (1974) FEBS Lett., 49, 163-166.
4. Носова В. В., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1975) Биооргани. химия, 1, 1130-1133.
5. Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1972) Ж. общ. химии, 42, 1630.
6. Verheyden D., Wehrli W., Moffatt J. G. (1965) J. Amer. Chem. Soc., 87, 2265-2277.
7. Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1973) Химия гетероцикл. соед., 3, 413.
8. Shumyantzeva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. (1976) Nucleic Acids Res., 3, 903-916.
9. Друца В. Д., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1977) Докл. АН СССР, 233, 595-597.
10. Зарытова В. Ф., Райт В. К., Черникова Т. С. (1977) Биооргани. химия, 3, 1626-1631.
11. Кнорре Д. Г., Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. (1977) Докл. АН СССР, 236, 613-616.
12. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С. (1973) Докл. АН СССР, 212, 630-637.
13. Hashimoto M., Mukaiyama T. (1971) Tetrahedron Lett., 2425-2428.
14. Mukaiyama T. (1976) Angew. Chem., 88, 111-120.
15. Mukaiyama T. (1976) Phosphorus and Sulfur, 1, 371-387.
16. Takaku H., Shimada Y., Nakajima Y., Hata T. (1976) Nucleic Acids Res., 3, 1233-1248.
17. Зарытова В. Ф., Курбатов В. А., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Самуков В. В., Шинкин Г. В. (1975) Биооргани. химия, 1, 793-799.
18. Богачев В. С., Веньяминова А. Г., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1970) Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук, вып. 6, № 14, 110-116.
19. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. (1976) Биооргани. химия, 2, 179-188.
20. Narang S. A., Jacob T. M., Khorana H. G. (1967) J. Amer. Chem. Soc., 89, 2153-2161.
21. Popp F. D. (1964) J. Med. Chem., 7, 210.

Поступила в редакцию
31.VII.1978

После доработки
24.XI.1978

SELECTIVE MODIFICATION OF MONOSUBSTITUTED PHOSPHATE GROUPS IN NUCLEOSIDE AND OLIGONUCLEOTIDE 5'-MONO- AND POLYPHOSPHATES

MISHENINA G. F., SAMUKOV V. V., SHUBINA T. N.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of Academy of Sciences
of the USSR, Novosibirsk; Special Bureau of Design and Technology
of Biologically Active Compounds, Novosibirsk*

A method is proposed for the synthesis of 5'-phosphoramidates of nucleoside and oligonucleotide 5'-mono- and polyphosphates. Treatment of the mixture of amine and nucleotide or oligonucleotide component in organic solvent (dimethylformamide, dimethylsulphoxide, pyridine) with an excess of condensing agent - triphenylphosphine/2,2'-dipyridyl disulfide at room temperature leads to selective and quantitative amidation of monosubstituted phosphate groups in nucleotide or oligonucleotide. Di-substituted phosphates do not react with the condensing agent under these conditions. The reaction may be carried out in an organic solvent containing up to 15% of water, if a higher excess of the condensing agent is employed.