



УДК 547.963.32 + 543.422.25

ОБРАТИМОЕ БЛОКИРОВАНИЕ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ
ФОСФОДИЭФИРНЫХ ГРУПП С ПОМОЩЬЮ
ДИЦИКЛОГЕКСИЛКАРБОДИИМИДА

Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В.

*Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Методом импульсной спектроскопии ^{31}P -ЯМР показано образование N -(P -5'- O -тримитилтимидин- P -3'- O -ацетилтимидин-5')-фосфорил- N,N' -дициклогексилмочевины (I) и N -(P -5'- O -тримитилтимидин- P -тимидин-5')-фосфорил- N,N' -дициклогексилмочевины (II) при взаимодействии N,N' -дициклогексилкарбодимида соответственно с $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d(\text{Ac})^*$ и $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d$. Показана устойчивость соединений (I) и (II) в процессе синтеза олигонуклеотидов, найдены мягкие условия (водный пиридин) удаления остатка дициклогексилмочевины с количественным превращением соединений (I) и (II) в $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$ и $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d$. Соединение (II) использовано в качестве нуклеозидного компонента в реакции с $\text{pT}_d(\text{Ac})$ и $\text{pT}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$ с применением дициклогексилкарбодимида, а также в реакции с этими же нуклеотидными компонентами, предварительно активированными с помощью триизопропилбензолсульфохлаорида. При этом с высоким выходом (70—90%) получены $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$ и $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$.

При синтезе олигонуклеотидов диэфирным методом в качестве нуклеотидного компонента используются мононуклеотиды или короткие олигонуклеотиды, которые при взаимодействии с конденсирующими агентами (триизопропилбензолсульфохлаоридом или дициклогексилкарбодимидом) образуют высокореакционноспособные фосфорилирующие производные [1—3]. Наличие фосфодиэфирных групп позволяет использовать ионообменную хроматографию для отделения продукта на каждой стадии синтеза. Однако, как показали исследования механизма олигонуклеотидного синтеза [4], фосфодиэфирные группы участвуют в ряде побочных реакций. При использовании в качестве конденсирующих агентов арилсульфохлаоридов с близкими скоростями образуются активные производные как по моноэфирной, так и по диэфирным группам нуклеозидного компонента. В последнем случае это приводит к образованию тетразамещенных пирофосфатов [4], которые, являясь активными фосфорилирующими соединениями, могут образовывать триэфиры, способные далее гидролизаться статистически, т. е. и по межнуклеотидным связям [5]. Кроме того, фосфодиэфирные группы нуклеозидного компонента значительно более нуклеофильны, чем оксигруппа того же компонента, и именно они в первую очередь реагируют с промежуточными фосфорилирующими производными нуклеотидного компонента. Поэтому для образования но-

* Сокращения приведены в соответствии с рекомендацией IUPAC — IUB (1971) J. Mol. Biol., 55, 299; например, $(\text{Tr})\text{T}_d$ — 5'- O -тримитилтимидин.

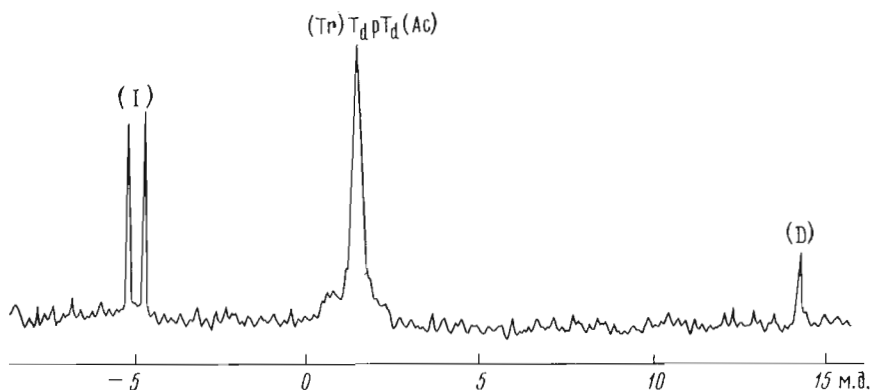
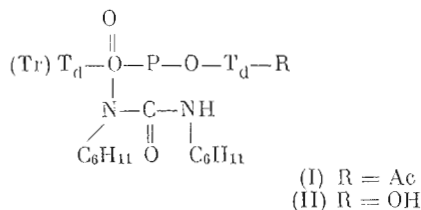


Рис. 1. Спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси, полученной через 52 мин после обработки $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$ (0,12 M) 10 эквивалентами дициклогексилкарбодимида

вых фосфодиэфирных связей приходится использовать большие избытки активированного нуклеотидного компонента [6].

Эти затруднения могут быть преодолены обратимым блокированием межнуклеотидных фосфодиэфирных групп нуклеозидного компонента перед каждой стадией конденсации. Использование такого блокирования позволит по-прежнему использовать диэфирный метод образования межнуклеотидной связи и ионообменную хроматографию для разделения реакционной смеси.

Ранее нами было показано, что при взаимодействии дициклогексилкарбодимида с динуклеозидфосфатом $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$ образуется соединение (I), у которого межнуклеотидная фосфатная группа блокирована остатком дициклогексилмочевины [3].



При добавлении воды это соединение гидролизуеться до исходного $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$. Таким образом, обработку нуклеозидного компонента дициклогексилкарбодимидом можно рассматривать как способ обратимого блокирования фосфодиэфирных групп.

С этой целью в данной работе проведено исследование устойчивости производных дициклогексилмочевины типа (I) и (II) в условиях синтеза олигонуклеотидов и возможности их использования в качестве нуклеозидного компонента.

При взаимодействии $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$ с 10 эквивалентами дициклогексилкарбодимида в пиридине в спектрах ^{31}P -ЯМР помимо сигнала исходного $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$ (δ 1,3 м.д.) регистрируются сигналы P^1 , P^2 -бис-(5'-О-трифосфат)- P^1 , P^2 -бис-(3'-О-ацетилтимидин-5')-пирофосфата (D) (δ 13,8 м. д.) и сигналы соединения (I) (δ - 4,8 и -5,2 м. д.) (рис. 1). Наличие двух сигналов для соединения (I) обусловлено существованием двух его диастереомерных форм [7, 8]. Как видно из кинетических кривых (рис. 2), количество соединения (D) не превышает 15%, в то время как соединение (I) становится главным продуктом превращения (~85%) уже через 8 ч реакции. Через 50 ч реакционная смесь (смесь 1) содержит 98% соединения (I) и 2% $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$.

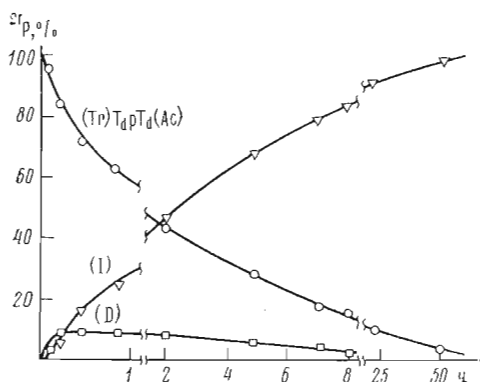


Рис. 2

Рис. 2. Кинетические кривые взаимодействия $(Tr)T_d p T_d (Ac)$ (0,12M) с 10 эквивалентами дидецилогексилкарбодимида

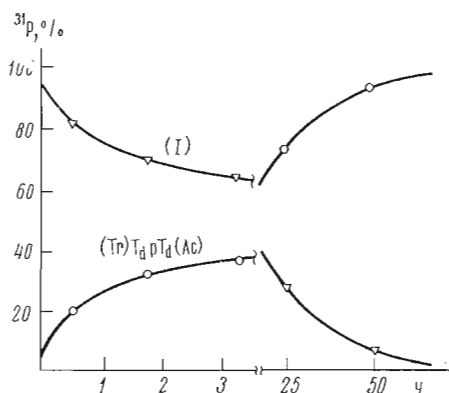


Рис. 3

Рис. 3. Кинетические кривые взаимодействия соединения (I), (0,1 M) со 100 эквивалентами воды в пиридине

Далее была исследована устойчивость соединения (I) в условиях синтеза олигонуклеотидов, а также возможность удаления остатка дидецилогексилмочевины в мягких условиях. Устойчивость соединения (I) исследовали в присутствии триизопропилбензолсульфохлорида (конденсирующего агента), триизопропилбензолсульфокислоты (побочного продукта конденсации), активного производного мононуклеотида (B) (электрофильного реагента) [3], алифатических аминов (нуклеофильных реагентов, более сильных, чем оксигруппа нуклеозидного компонента). Полученные результаты (табл. 1) свидетельствуют о том, что производное дидецилогексилмочевины (I) в течение длительного времени не вступает во взаимодействие ни с одним из исследованных реагентов, т. е. оно устойчиво в условиях синтеза олигонуклеотидов.

Далее нами было исследовано удаление защитной группы в мягких условиях. Из рис. 3 видно, что добавление воды к реакционной смеси, содержащей соединение (I), дидецилогексилкарбодимид и дидецилогексилмочевину, и выдерживание смеси при комнатной температуре приводит к практически количественному отщеплению остатка дидецилогексилмоче-

Таблица 1

Состав реакционных смесей (% ^{31}P), полученных при действии электрофильных и нуклеофильных реагентов на пиридиневый раствор соединения (I)

Добавляемый реагент	Время реакции, ч	Соединение (I)	$(Tr)T_d p T_d (Ac)$	Соединение D
Исходная смесь	0	85	15	—
Триизопропилбензолсульфохлорид, 2 экв.	4	87	—	13
Триизопропилбензолсульфокислота, 2 экв.	16	94 *	2	4
Анилин, 45 экв.	16	86	14	—
Морфолин, 65 экв.	16	82	18	—
Циклогексилламин, 40 экв.	16	87	13	—
Соединение (B), 12 экв.	20	90 **	—	—

* Исходная смесь содержала 90% соединения (I) и 10% $(Tr)T_d p T_d (Ac)$.

** 10% ^{31}P находится в составе тризамещенного пирофосфата, образующегося в результате взаимодействия $(Tr)T_d p T_d (Ac)$ с вносимым в реакционную смесь соединением (B).

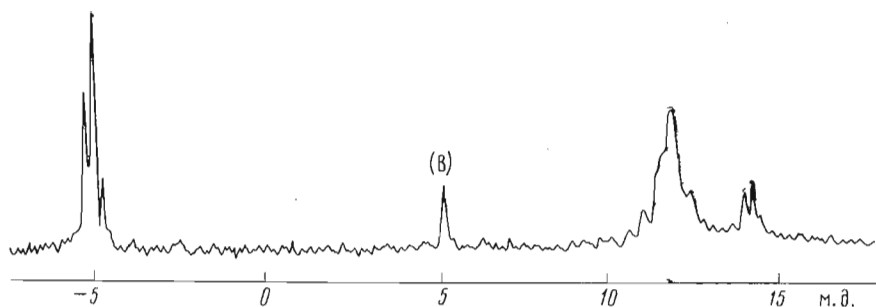


Рис. 4. Спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси, полученной при взаимодействии соединения (B) (0,08 M) со смесью 2, содержащей соединение (II) (0,07M). Спектр записан через 2 ч.

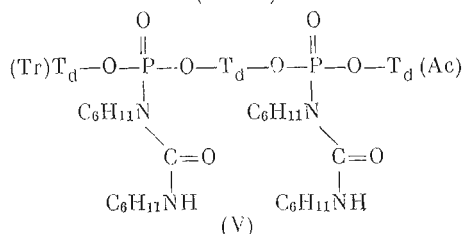
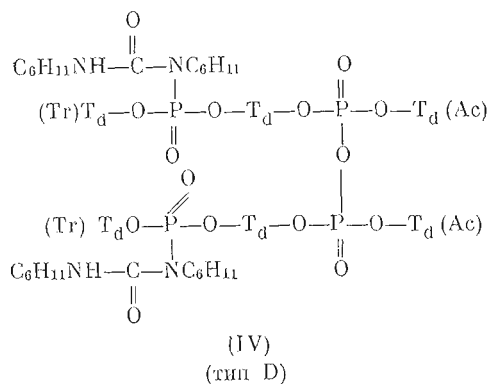
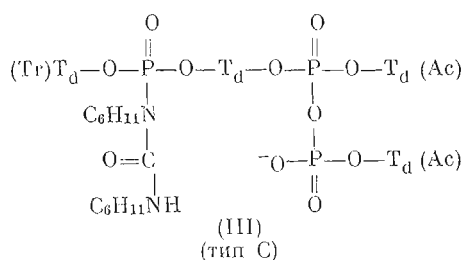
вины. Через 50 ч практически единственным продуктом гидролиза соединения (I), по данным ^{31}P -ЯМР, хроматографии на бумаге и электрофореза, является исходный динуклеозидфосфат $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{rT}_{\text{d}}(\text{Ac})$. Таким образом, остаток дициклогексилмочевины может быть удален в мягких условиях, когда стабильны как межнуклеотидная связь, так и большинство защит, используемых для блокирования аминогрупп гетероциклических оснований и оксигрупп рибозы. Образующийся олигонуклеотид может быть после этого выделен обычными методами ионообменной хроматографии. При взаимодействии дициклогексилкарбодиимида с $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{rT}_{\text{d}}$, т. е. с динуклеозидфосфатом с незащищенной оксигруппой, в спектрах ^{31}P -ЯМР регистрируются сигналы исходного $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{rT}_{\text{d}}$ (δ 1,3 м. д.), тетразамещенного пирофосфата (D) (δ 13,8 м. д.) и N-(P-5'-O-тригилтимидин-Р-тимидин-5')-фосфорил-N,N'-дициклогексилмочевины (II) (δ -4,8 и -5,2 м. д.). Через 20 ч соединение (II) становится главным (80%) продуктом реакции. Соединение (D) регистрируется в незначительном количестве (менее 15%).

Таким образом, наличие свободной оксигруппы нуклеозидного компонента не вносит существенных изменений в процесс блокирования межнуклеотидной фосфатной группы.

Для выяснения возможности использования соединения (II) в качестве нуклеозидного компонента было исследовано его взаимодействие с $\text{rT}_{\text{d}}(\text{Ac})$ и $\text{rT}_{\text{d}}\text{rT}_{\text{d}}(\text{Ac})$. Реакция была проведена в двух вариантах. В первом варианте к реакционной смеси, содержащей 80% производного (II), 10% $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{rT}_{\text{d}}$ и 10% тетразамещенного пирофосфата (D), а также непрореагировавший дициклогексилкарбодиимид и дициклогексилмочевину (смесь 2), добавляли активное производное нуклеотидного компонента (B), полученное при действии на него избытка триизопропилбензолсульфохлорида. Во втором варианте к смеси 2 добавляли нуклеотидный компонент, который реагировал с нуклеозидным компонентом за счет избытка дициклогексилкарбодиимида, присутствующего в смеси 2.

В первом варианте реакции в спектре ^{31}P -ЯМР реакционной смеси наряду с сигналами соединений (II) и (B) появляются сложные сигналы в области 11—13 и 13—14 м. д., типичной для тризамещенных (типа C) и тетразамещенных (типа D) пирофосфатов соответственно (рис. 4) [3]. Кроме того, структура сигналов в области -5 м. д. при этом усложняется (ср. рис. 1 и 4). Эти факты свидетельствуют о том, что в реакционной смеси присутствуют соединения, содержащие наряду с фосфорильной группировкой дициклогексилмочевины три- и тетразамещенные пирофосфатные фрагменты. Такими производными могут являться соединения (III) и (IV), подобные соединениям типа (C) и (D), образующимся при взаимодействии $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}$ с соединением (B) [1, 4, 9]. При длительном выдерживании реакционной смеси наблюдается увеличение интенсивности сигналов в области -5 м. д. в 1,5 раза за 25 ч и происходит дальнейшее усложнение их структуры. Это указывает на появление новых блокированных межнуклео-

тидных фосфатных группировок, т. е. на образование соединения типа (V).



Обработка реакционной смеси водой приводит к образованию $(\text{Tr})\text{T}_d\text{rT}_d\text{rT}_d(\text{Ac})$ и $\text{rT}_d(\text{Ac})$. Выход тринуклеозиддифосфата (по нуклеозидному компоненту) составляет по данным ^{31}P -ЯМР 85 %, по данным хроматографии на бумаге — 82 %.

При добавлении $\text{rT}_d(\text{Ac})$ к смеси 2, содержащей соединение (II) и избыток дициклогексилкарбодиимида (вариант 2) в первый период реакции сигналы соединения (II) остаются без изменения и регистрируются стадии превращения мононуклеотида, обусловленные его реакцией с дициклогексилкарбодиимидом. При этом образуется симметричный пирофосфат (δ 10,3 м. д.), тринуклеозидтрифосфат (дублет с центром при 11,5 м. д. и триплет с центром при 21,6 м. д. и $J_{\text{P-O-P}}$ 17,5 Гц) и регистрируется незначительное количество (5 %) N-[P¹,P²-бис-(3'-O-ацетилтимидин-5')] -пирофосфорил-N,N'-дициклогексилмочевины (сигналы в области 5—6 и 11—12 м. д. [3]). Однако в спектре конечной реакционной смеси (60 ч) обнаруживаются лишь две группы сложных сигналов: в области —5 и 11—13 м. д. Наличие последних сигналов указывает на присутствие в реакционной смеси соединения с тризамещенной пирофосфатной группировкой. На основании полученных данных можно предположить, что главным конечным продуктом реакции в этих условиях является соединение (III).

Блокирование вновь образующейся межнуклеотидной группы, т. е. образование соединения (V), происходит в незначительной степени, что может быть связано с наличием в системе избытка нуклеотидного компонента. В работе [3] показано, что при взаимодействии $(\text{Tr})\text{T}_d$ с избытком $\text{rT}_d(\text{Ac})$ в присутствии дициклогексилкарбодиимида в качестве главного

продукта образуется тризамещенный пирофосфат (С), а не производное дидиклогексилмочевины.

Обработка реакционной смеси водой приводит к образованию $(Tr)T_{ар}T_{ар} \cdot T_d(As)$ и $pT_d(As)$. Выход тринуклеозиддифосфата в расчете на нуклеозидный компонент составил 94% по данным хроматографии на бумаге и практически количественный по данным ^{31}P -ЯМР.

Далее было исследовано взаимодействие соединения (II) с динуклеотидом, предварительно активированным с помощью 4 эквивалентов триизопропилбензолсульфохлаорида. В этом случае наблюдать за ходом реакции по появлению сигналов в области 10—14 м. д. не представляется возможным, так как в этой же области находятся сигналы активных форм динуклеотидов [2]. Интенсивность сигналов в области —5 м. д.

не изменяется, т. е. остаток дидиклогексилмочевины сохраняется на протяжении всего синтеза олигонуклеотидов (20 ч). После 60 ч реакции смесь была разложена водой. В спектре, записанном через 26 ч после добавления воды (рис. 5), регистрируются сигналы с центром при 1,2 м. д. (сигнал фосфодиэфирных групп исходных $(Tr)T_{ар}T_d$ и $pT_{ар}T_d(As)$ и полученного $(Tr)T_{ар}T_{ар}T_{ар}T_d(As)$), а также сигнал с δ —0,7 м. д. (сигнал концевое фосфата динуклеотида $pT_{ар}T_d(As)$). Выход тетра-нуклеозидтрифосфата, по данным хроматографии на бумаге, в расчете на нуклеозидный компонент составил 80%.

При добавлении к смеси 2 трехкратного избытка неактивированного $pT_{ар}T_d(As)$ интенсивность сигналов в области —5 м. д. в спектрах реакционной смеси практически не изменяется. В начальные моменты реакции помимо сигналов исходного (II) и $pT_{ар}T_d(As)$ регистрируются сигналы симметричного динуклеозидпирофосфата (δ 11 м. д.), а также сигналы в области 12—14 м. д., которые могут быть отнесены к сигналам активных форм динуклеотида, согласно [2]. Здесь же могут быть сигналы образующихся соединений, имеющих три- или тетразамещенные пирофосфатные группировки. Спектр реакционной смеси после разложения водой в течение 30 ч при комнатной температуре аналогичен спектру рис. 5.

Выход $(Tr)T_{ар}T_{ар}T_{ар}T_d$, по данным хроматографии на бумаге, относительно $(Tr)T_{ар}T_d$ 61%.

Полученные результаты позволяют рассчитывать на использование обратимого блокирования фосфодиэфирных групп с помощью дидиклогексилкарбодимида для синтеза более длинных олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

В работе использовали 5'-О-тримитимидил- $(3' \rightarrow 5')$ -3'-О-ацетилтимидин $[(Tr)T_{ар}T_d(As)]$ [10], 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфат $[(pT_d(As)]$ [10], 3'-О-ацетилтимидил- $(5' \rightarrow 3')$ -тимидин-5'-фосфат $[pT_{ар}T_d(As)]$ [15], переглянные над щелочью анилин, циклогексиламин, морфин (препараты марки х. ч.). В качестве конденсирующих реагентов использовали N,N'-дидиклогексилкарбодимид и триизопропилбензолсульфохлаорид. Реакции проводили в пиридине, содержащем не более 0,05% воды, который хранили над молекулярными ситами типа 4 А. Для хроматографии ис-

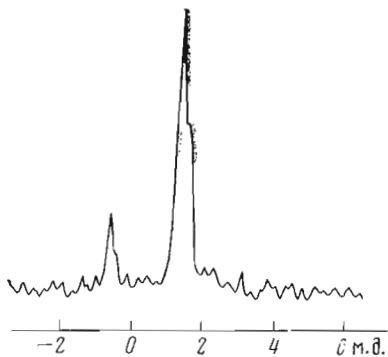


Рис. 5. Спектр ^{31}P -ЯМР, записанный после гидролиза реакционной смеси, полученной при взаимодействии $pT_{ар}T_d(As)$ (0,09M), предварительно активированным 4 эквивалентами триизопропилбензолсульфохлаорида, со смесью 2, содержащей соединение (II) (0,04 M)

пользовали бумагу FN-1 и системы растворителей: этанол — 1М ацетат аммония (рН 7,5), 5 : 2 (А), изопропанол — конц. аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (Б).

Спектры ^{31}P -ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-НС 12 (Bruker-Physic AG, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно 85 %-ной H_3PO_4 как внешнего стандарта. Спектры записывали с гетероядерным подавлением спин-спиновой связи ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$. Диаметр используемой ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,5 мл. Детали эксперимента описаны в работе [4]. Количественную обработку результатов проводили по интегральным кривым, принимая за 100 % сумму интегральных интенсивностей по всему спектру. Точность интегрирования 10 %.

Выход олигонуклеотидов в мольных процентах (в расчете на нуклеозидный компонент) по данным ^{31}P -ЯМР определяли, сравнивая соотношение интенсивностей сигналов концевых и межнуклеотидных атомов фосфора, с учетом начальных загрузок нуклеотидного и нуклеозидного компонентов, а также количества атомов фосфора во всех олиго- и мононуклеотидах, присутствующих в реакционной смеси.

N-(*P*-5'-*O*-Тритилтимидин-*P*-3'-*O*-ацетилтимидин-5')-фосфорил-*N*, *N*'-дициклогексилкарбодимид (I). 0,15 ммоль (Tr)T_{ар}T_д(Ac) растворили в 1 мл абсолютного пиридина и выдержали с 10-кратным избытком дициклогексилкарбодимид в течение 50 ч при комнатной температуре. За ходом реакции следили по спектрам ^{31}P -ЯМР (данные на рис. 1 и 2). Конечная реакционная смесь (смесь 1) содержала 98 % соединения (I) и 2 % (Tr)T_{ар}T_д(Ac).

Гидролиз соединения (I). К 1 мл смеси 1 добавили 0,2 мл H_2O . За ходом гидролиза следили по спектрам ^{31}P -ЯМР (данные на рис. 3).

После 50 ч гидролиза реакционную смесь обрабатывали концентрированным аммиаком в течение 3 ч с целью удаления ацетильной защиты. Анализ методом хроматографии на бумаге (системы А и Б) свидетельствовал о наличии только (Tr)T_{ар}T_д.

Соединение (B) получено по методике работы [7].

N-(*P*-5'-*O*-Тритилтимидин-*P*-тимидин-5')-фосфорил-*N*, *N*'-дициклогексилкарбодимид (II). 0,225 ммоль (Tr)T_{ар}T_д растворили в 1,5 мл пиридина и выдержали с 10-кратным избытком дициклогексилкарбодимид в течение 50 ч при комнатной температуре. За ходом реакции следили по спектрам ^{31}P -ЯМР. Конечная реакционная смесь (смесь 2) состояла из 80 % соединения (II), 10 % (Tr)T_{ар}T_д и 10 % соединения (D).

Взаимодействие соединения (II) с соединением (B). К 1,2 мл смеси 2, содержащей 0,12 ммоль соединения (II), добавили 0,65 мл 0,23 М пиридинового раствора соединения (B) и выдержали в течение 20 ч при комнатной температуре. За ходом реакции следили по спектрам ^{31}P -ЯМР. Для разложения реакционной смеси добавляли воду (0,1 мл) и выдерживали смесь в течение 30 ч. По данным ^{31}P -ЯМР, выход (Tr)T_{ар}T_{ар}T_д(Ac) составил 85 %. После удаления ацетильной защиты аммиаком реакционную смесь анализировали методом хроматографии на бумаге в системах А и Б. Значения R_f приведены в табл. 2. Выход (Tr)T_{ар}T_{ар}T_д, рассчитанный по оптической плотности элюатов соответствующих соединений и принятых коэффициентов экстинкции, согласно [10] составлял 82 % (ϵ для rT_d — 9600, (Tr)T_{ар}T_д — 18 500, (Tr)T_{ар}T_{ар}T_д — 25 800).

Взаимодействие соединения (II) с rT_d (Ac). К 1,2 мл смеси 2, содержащей 0,05 ммоль соединения (II), добавили 0,135 ммоль rT_d (Ac) и реакционную смесь выдержали при комнатной температуре в течение 60 ч. Контроль за ходом реакции и анализ конечных продуктов проводили аналогично предыдущей методике. Выход (Tr)T_{ар}T_{ар}T_д по данным ^{31}P -ЯМР близок к количественному, по данным хроматографии на бумаге — 94 %.

Активация rT_d рT_д(Ac) с помощью триизопропилбензолсульфохлорида. 0,13 ммоль rT_d рT_д(Ac) растворили в 0,4 мл пиридина, добавили 0,52 ммоль

триизопрпилбензолсульфохлорида и выдержали при комнатной температуре в течение 2 ч.

Взаимодействие соединения (II) с $pT_{ар}T_d(As)$, активированным триизопрпилбензолсульфохлоридом. К 1 мл смеси 2, содержащей 0,04 ммоль соединения (II), добавили 0,4 мл 0,32 М пиридиневого раствора смеси активных форм $pT_{ар}T_d(As)$ и выдержали 60 ч. Контроль за ходом реакции, анализ и разложение реакционной смеси проводили как указано выше.

Таблица 2

Значения R_f исследуемых соединений

Соединение	R_f в системах		Соединение	R_f в системах	
	А	Б		А	Б
pT_d	0,33	0,17	$(Tr)T_d pT_d pT_d$	0,76	0,58
$pT_{ар}pT_d$	0,22	0,13	$(Tr)T_d pT_{ар}pT_{ар}pT_d$	0,68	0,48
$(Tr)T_d pT_d$	0,85	0,77			

Значения R_f приведены в табл. 2. Спектр ^{31}P -ЯМР конечной реакционной смеси дан на рис. 5. Выход $(Tr)T_{ар}pT_{ар}pT_{ар}pT_d$, согласно хроматографии на бумаге, составил 80%.

Взаимодействие соединения (II) с $pT_{ар}T_d(As)$. К 1,2 мл смеси 2, содержащей 0,05 ммоль соединения (II), добавили 0,14 ммоль $pT_{ар}T_d(As)$ и реакционную смесь выдержали 65 ч. Контроль за ходом реакции, разложение реакционной смеси и анализ конечных продуктов проводили как указано выше. Значения R_f приведены в табл. 2. Выход $(Tr)T_{ар}pT_{ар}pT_{ар}pT_d$, по данным хроматографии на бумаге, 61%.

ЛИТЕРАТУРА

- Knorre D. G., Lebedev A. V., Levina A. S., Rezvukhin A. I., Zarytova V. F. (1974) *Tetrahedron* 30, 3073—3079.
- Бадаткеева А. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Шубина Т. Н. (1975) Докл. АН СССР, 222, 97—100.
- Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В. (1976) Биорган. химия, 2, 189—198.
- Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, вып. 3, 126—131.
- Kössel H., Moon M. W., Khorana H. G. (1967) *J. Amer. Chem. Soc.*, 89, 2148—2154.
- Knorre D. G., Zarytova V. F. (1974) Recent developments in oligonucleotide synthesis and Chemistry of minor bases of tRNA, Poznan, 89—124.
- Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 4, вып. 2, 139—149.
- Лебедев А. В., Резвухин А. И. (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 4, вып. 2, 149—154.
- Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, вып. 3, 121—125.
- Gilham P. T., Khorana H. G. (1958) *J. Amer. Chem. Soc.*, 80, 6212—6222.

Поступила в редакцию
9.III.1976

REVERSIBLE BLOCKING OF PHOSPHODIESTER GROUPS THROUGH THE USE OF DICYCLOHEXYLCARBODIIMIDE

ZARYTOVA V. F., IVANOVA E. M., LEBEDEV A. V.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The conversion of $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$ and $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d$ into N-(P-5'-O-tritylthymidine-P-3'-O-acetylthymidine-5')-phosphoryldicyclohexylurea (I) and N-(P-5'-O-tritylthymidine-P-thymidine-5')-phosphoryldicyclohexylurea (II), respectively, in the presence of the excess of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) was demonstrated by means of pulsed ^{31}P -NMR spectroscopy. The stability of I and II was investigated under the conditions of oligonucleotide synthesis. The dicyclohexylurea residue could be readily removed under mild conditions. The compound II was used as a nucleoside component in the reaction with $\text{pT}_d(\text{Ac})$ and $\text{pT}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$ in the presence of DCC excess, as well as in the reaction with $\text{pT}_d(\text{Ac})$ and $\text{pT}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$, which were preliminary activated by triisopropylbenzenesulphonyl chloride. $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$ and $(\text{Tr})\text{T}_d\text{pT}_d\text{pT}_d\text{pT}_d(\text{Ac})$ were obtained in a good yield (70-90%).
