

9. Semisotnov G. V., Zikherman K., Kasatkina S. B. Polarized luminescence and mobility of tryptophan residues in polypeptide chains // Biopolymers.— 1981.— 20, N 8.— P. 2287—2309.
10. Буриштейн Э. А. Собственная люминесценция белка. Природа и применение.— М.: ВИНТИ, 1977.— 190 с.— (Сер. Биофизика; Т. 7).
11. Эдсолл Дж., Гатфренд Х. Биотермодинамика.— М.: Мир, 1986.— 195 с.
12. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты.— М.: Мир, 1982.— 889 с.
13. Древалъ В. И., Финашин А. В. Влияние периферических белков на активность Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран // Укр. биохим. журн.— 1990.— 62, № 4.— С. 87—89.

Харьков. гос. ун-т

Получено 15.03.91

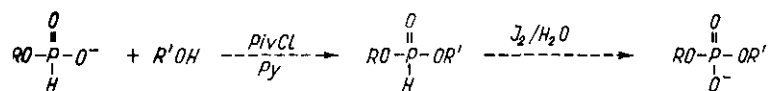
УДК 577.113.6

И. Я. Дубей, Т. В. Ляпина, Д. М. Федоряк

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОБОЧНЫХ РЕАКЦИЙ В СИНТЕЗЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК Н-ФОСФОНАТНЫМ МЕТОДОМ

Изучены основные побочные реакции, сопутствующие межнуклеотидной конденсации в Н-фосфонатном методе олигонуклеотидного синтеза, и исследована их кинетика в присутствии ряда оснований. Найдены устойчивые модификации гетероциклических оснований пивалоилхлоридом. Показано, что ацилирование Р—Н-связей приводит к расцеплению олигонуклеотидной цепи в местах, содержащих Р—С-связи. Обнаружено, что скорость побочных реакций в несколько раз ниже в хиолине, чем в более основном пиридине.

Введение. Последние достижения генетической инженерии и биотехнологии сопровождались и в значительной степени были обусловлены прогрессом в области химического синтеза фрагментов ДНК. Доступность олигонуклеотидов заданной последовательности революционизировала биологические исследования на молекулярном уровне. Синтетические олигонуклеотиды используются в химико-ферментативном синтезе генов, при секвенировании ДНК, для направленного мутагенеза, как гибридизационные зонды при выделении и клонировании генов и т. д. [1, 2]. Таким образом, спектр применения синтетических фрагментов ДНК весьма широк и потребность в них постоянно возрастает. В последнее время все большее распространение получает Н-фосфонатный метод олигонуклеотидного синтеза [3, 4], отличающийся простотой, высокой скоростью и эффективностью (схема 1). Однако существенным



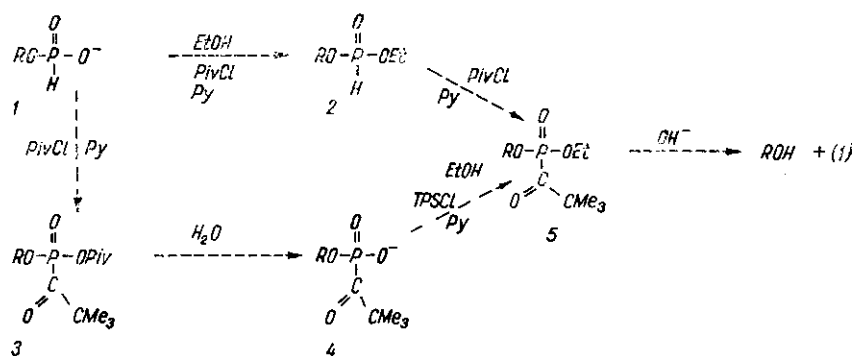
RR' — остатки нуклеозидов; $\text{Piv} = \text{Me}_3\text{C}-\text{CO}-$; Py — пиридин

недостатком метода является протекание побочных реакций, вызываемых используемым для активации нуклеотидного компонента конденсирующим реагентом, что ведет к значительному снижению эффективности синтеза. Этому вопросу был посвящен ряд работ [5, 6], в которых описаны основные типы побочных реакций, сопутствующих Н-фосфонатной межнуклеотидной конденсации. В настоящей работе продолжено изучение побочных процессов в присутствии пивалоилхлорида (PivCl) — основного конденсирующего реагента, применяемого в Н-фосфонатном методе синтеза олигонуклеотидов.

Материалы и методы. В работе использованы метилимдазол (MeIm), диметиламинопиридин (DMAP), PivCl, 2, 6-лутидин («Fluka», Швейцария), γ -пиколин, 2, 4, 6-коллидин, ацетонитрил для ВЭЖХ

© И. Я. ДУБЕЙ, Т. В. ЛЯПИНА, Д. М. ФЕДОРИЯК, 1992

(«Merck», ФРГ). Остальные реагенты и растворители отечественного производства. Хинолин перегоняли в вакууме. Растворители очищали и абсорбировали согласно [7]. ТСХ проводили на пластинках Silufol UV 254 («Kavalier», ЧСФР) в системе CHCl_3 — MeOH (9 : 1). Адсорбционную хроматографию вели на сорбенте Kieselgel 60 («Fluka»), ТМС-силикагель получали согласно [8]. Обращенно-фазовую ВЭЖХ олигонуклеотидов осуществляли на колонке Lichrosorb RP-18 ($4,6 \times 120$ мм, «Merck») с использованием градиента концентрации ацетонитрила в 0,1 М триэтиламмонийацетатном буфере (хроматограф Altex-332 (США), скорость потока 1 мл/мин). Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-46 («ЛОМО», СССР). Защищенные нуклеозиды и Н-фосфонаты получали согласно [4, 7]. Твердофазный синтез олигонуклеотидов осуществляли в ручном варианте; синтетический цикл, деблокирование и выделение продуктов соответствовали приведенным в [9, 10], однако конденсации проводили в смеси CH_3CN — Py (4 : 1).



$R = d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]T^-$; TPSCl — триизопропилбензолсульфонилхлорид

Нуклеозид этил-Н-фосфонат (2) (схема 2). 0,2 ммоль нуклеозид-Н-фосфоната (1) и 0,5 ммоль EtOH растворили в 1 мл смеси CH_3CN — Py (4 : 1), прибавили 1 ммоль PivCl. Через 3 мин реакционную смесь разбавили CHCl_3 (10 мл), несколько раз промыли 0,5 М ТЕАВ и водой. Хлороформный раствор сушили Na_2SO_4 , упарили с толуолом. Продукт осаждали в гексан. Выход 90 %.

Нуклеозид ацилфосфонат (4). 0,2 ммоль нуклеозид-Н-фосфоната (1) растворили в 2 мл смеси CH_3CN — Py (4 : 1), добавили 1 ммоль PivCl и выдержали в течение 5 ч. Затем добавили 2 мл 0,5 М ТЕАВ. Через 30 мин смесь разбавили в несколько раз 0,5 М ТЕАВ, экстрагировали CHCl_3 (2×15 мл). Экстракт промыли 0,5 М ТЕАВ (дважды) и водой, сушили Na_2SO_4 и упаривали с толуолом. Продукт выделяли обращенно-фазовой хроматографией на ТМС-силикагеле в градиенте концентрации диоксана (20—80 %) в 0,1 М триэтиламмонийацетатном буфере. Фракцию, содержащую (4), разбавили в 3 раза 0,25 М ТЕАВ, экстрагировали несколько раз CHCl_3 . Экстракт промыли водой, высушили Na_2SO_4 , упарили. Выход после осаждения в гексан 65 %.

Нуклеозид этилацилфосфонат (5). 0,1 ммоль (4) в смеси CH_3CN — Py (4 : 1) конденсировали с 0,2 ммоль EtOH в присутствии 0,3 ммоль TPSCl. Через 40 мин к реакционной смеси добавили несколько объемов 0,5 М ТЕАВ и дважды экстрагировали CHCl_3 . Экстракт промывали 0,5 М ТЕАВ и водой, сушили Na_2SO_4 и упаривали с толуолом. Продукт выделяли хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации метанола (0—2 %) в CHCl_3 и осаждали в гексан. Выход 78 %.

Кинетические исследования. Для определения выхода реакции ацилирования ОН-компонента 0,05 М $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]TрН$ конденсировали с 0,8 экв. dbzA(Bz) в присутствии 5 экв. PivCl. Через

Т мни определяли выход продукта ацилирования анализом алиquotы реакционной смеси ТСХ. Пятна dbzA(Bz) и d(Piv)bz(Bz) элюировали смесью CHCl_3 —MeOH (4 : 1) и определяли оптическую плотность элюатов при 260 нм. В остальных случаях реакционные смеси через определенные интервалы анализировали ТСХ, пятна тритилсодержащих продуктов и исходных соединений элюировали 2 % CF_3COOH в CH_2CN и определяли оптическую плотность элюатов при 500 нм.

Результаты и обсуждение. Основными возможными центрами протекания побочных реакций электрофильного конденсирующего реагента PivCl в Н-фосфонатном методе являются гидроксильная группа нуклеозидного компонента, лактамные системы гетероциклических оснований и Р- Н-связи в продуктах конденсации.

Ацилирование ОН-компонента реакции конденсации. Конкурентное взаимодействие пространственно затрудненного PivCl с нуклеозидным компонентом в обычных условиях протекает значительно медленнее, чем реакция конденсации (в Н-фосфонатном методе это справедливо и для других побочных реакций). Конденсация в пиридине проходит за 20—30 с и образование продукта ацилирования ОН-компонента не зафиксировано. В присутствии соединений, более основных, чем пиридин (pK_a 5,2), таких как γ -пиколин (pK_a 6,0), 2,6-лутидин (pK_a 6,6) или 2, 4, 6-коллидин (pK_a 7,4), реакция конденсации протекает столь же быстро, однако сопряжена со значительным ацилированием нуклеозидного компонента, и количество 5'-ацилированного нуклеозида увеличивается с ростом основности пиридинов (таблица). В отличие от соединений пиридинового ряда триэтиламин (pK_a 10,9) не обладает свойствами нуклеофильного катализатора, и в его присутствии скорость реакции конденсации значительно ниже [9, 11]. В этом случае скорость реакции ацилирования становится сопоставимой со скоростью конденсации. В присутствии высокоэффективных нуклеофильных катализаторов типа MeIm (pK_a 7,3) или ДМАР (pK_a 9,6) нуклеозид-Н-фосфонат (1) при взаимодействии с PivCl с высокой скоростью превращается в малоактивные в реакции конденсации ацилфосфонатные соединения [11], однако реакция ацилирования ОН-компонента PivCl резко ускоряется этими основаниями по сравнению с пиридином.

Более активные, чем PivCl, хлорангидриды при использовании их в качестве конденсирующих реагентов дают и более высокий уровень протекания побочных реакций. Так, при конденсации в присутствии изобутирилхлорида или изобутилхлорформиата в реакционной смеси содержится 10—20 % 5'-ацилированного нуклеозида.

Выход продукта существенно падает и при проведении конденсации в пиридине, содержащем примеси сильных оснований. Но обычно в Н-фосфонатном синтезе реакция PivCl с ОН-компонентом не представляет опасности. (В твердофазном синтезе часто большую роль играет фактор недостаточной экранирующей активности PivCl [9, 12].)

Модификация гетероциклических оснований. Лактамные системы гуаниновых и, в меньшей степени, тиминových ос-

Ацилирование ОН-компонента в процессе реакции межнуклеотидной конденсации в смеси ацетонитрил—основание (4:1)

Основание	5'-ацилированный ОН-компонент, %	Основание	5'-ацилированный ОН-компонент, %
Пиридин	—	Триэтиламин*	32
γ -Пиколин	8	Метилмидазол	30
2, 6-Лутидин	15	Диметиламинопиридин**	68
2, 4, 6-Коллидин	21		

* Реакцию проводили в смеси ацетонитрил—хлористый метилен—триэтиламин (7:2:1). Хлористый метилен добавлен для лучшей растворимости нуклеозида; ** реакцию проводили в смеси ацетонитрил—хлористый метилен—диметиламинопиридин (7:2:1).

татков способны взаимодействовать с электрофилами — конденсирующими реагентами и активированными Р-компонентами [13]. Ранее показано [5], что PivCl ацилирует остаток гуанина, однако O⁶-ацильное производное легко гидролизуется, регенерируясь в исходный нуклеозид. В связи с этим считалось, что модификация гетероциклических оснований PivCl не является проблемой Н-фосфонатного синтеза, поскольку она обратима в процессе аммонолиза. В работах [4, 12] не было обнаружено устойчивой модификации гетероциклических оснований в олигонуклеотидах, полученных с применением PivCl. Однако размытая форма полос олигонуклеотидов, наблюдаемая нами при гель-электрофорезе, свидетельствует о заметной модификации и в этом случае. Это

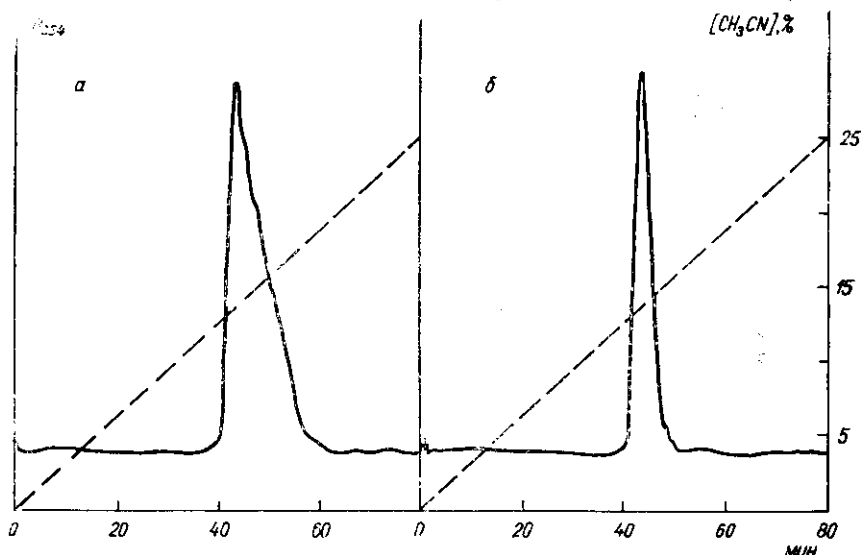


Рис. 1. Анализ полностью деблокированного олигонуклеотида d(CGT CGT GGT GGT GGT GGT GGT), полученного Н-фосфонатным методом в стандартных условиях (а) и с использованием O⁶-дифенилкарбамоильной защитной группы гуанозина (б), обращенно-фазовой ВЭЖХ

подтверждается и данными обращенно-фазовой ВЭЖХ олигонуклеотидов, особенно при высоком содержании гуанозина (рис. 1, а). Вероятно, в ходе синтеза происходит нуклеофильное замещение O⁶-ацильных групп в производных гуанозина пиридином (или другим нуклеофилом) подобно тому, как это наблюдается в фосфотриэфирном методе [14]. По аналогичному механизму, видимо, происходит и модификация олигонуклеотидов, обнаруженная при использовании арилсульфопроизводных в качестве конденсирующих реагентов в Н-фосфонатном синтезе [15].

Модификация снижает эффективность синтеза и существенно осложняет очистку целевых фрагментов ДНК. Одним из решений данной проблемы является защита лактамной системы гуанозина. С этой целью нами использована N, N-дифенилкарбамоильная (DPC) защитная группа, которая удаляется в процессе аммонолиза [16] одновременно с N-ацильными защитными группами. Применение в синтезе Н-фосфоната N²-iBu-O⁶-DPC-гуанозина позволило значительно повысить чистоту получаемых олигонуклеотидов (рис. 1, б). Другим способом повышения эффективности синтеза может стать снижение основности реакционной смеси. Так, скорость модификации гуанозина в хинолине (рК_a 4,8) в 2—2,5 раза ниже, чем в пиридине (рис. 2, а). Это одно из важных преимуществ разработанного нами нового варианта Н-фосфонатного синтеза, в котором растворителем в реакциях конденсации вместо пиридина использован менее основной хинолин [9—11].

Ацилирование Р—Н-связей в Н-фосфонатных диэфирах. Хотя некоторыми авторами и отмечалось [3—5], что Р—Н-связи в динуклеотид-Н-фосфонатах устойчивы в течение всего

синтеза и практически служат фосфатзащитными группами, в работе [6] было показано, что в пиридине идет медленное их ацилирование избытком PivCl с образованием динуклеозидацилфосфонатов. С повышением основности среды эта реакция ускоряется (рис. 2, б). Так, если в пиридине превращение диэфира (2) в ацилфосфонат (5) проходит за ночь, то в присутствии триэтиламина — за 20—25 мин, метилимидазола или смеси пиридин — триэтиламин реакция ацилирования заканчивается за несколько минут.

Скорость образования ацилфосфоната возрастает и в случае более активных хлорангидридов. Например, соединение (2) в пиридине ацилируется 5 экв. изобутирилхлорида за 40—60 мин.

Для изучения устойчивости образующихся ацилфосфонатов мы синтезировали нуклеозидэтилацилфосфонат (5) двумя путями — ацилированием диэфира (2) PivCl в пиридине и конденсацией нуклеозидацилфосфоната (4) со спиртом в присутствии TPSCl. (Соединение (4) получали гидролизом смешанного ангидрида ацилфосфоната (3), который, как показано ранее, образуется при продолжительной обработке нуклеозид-Н-фосфоната (1) PivCl [11, 17].) Оказалось, что ацилфосфонат (5) достаточно устойчив к окислению в обычных условиях

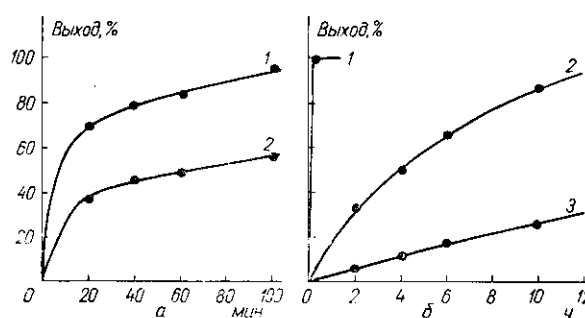


Рис. 2. Скорость побочных реакций Н-фосфонатной конденсации: а — модификация $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]ibG(\text{Bz})$ 10 экв. PivCl в ацетонитриле, содержащем 20 % пиридина (1) или хинолина (2); б — ацилирование Р—Н-связи диалкилфосфита 2,5 экв. PivCl в ацетонитриле, содержащем 20 % триэтиламина (1), пиридина (2) или хинолина (3)

(2 % J_2 в смеси $\text{Pu} - \text{H}_2\text{O}$ (98 : 2), 10 мин). В то же время в смеси концентрированный NH_3 — диоксан (3 : 2) он полностью расщепляется за 6 ч при 55 °С с образованием нуклеозида $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]T$ и Н-фосфоната (1). Как известно, диалкилацилфосфонаты деацилируются нуклеофилами [18], образующиеся при этом диалкилфосфиты гидролитически нестабильны [4, 19].

В связи с устойчивостью динуклеозидацилфосфонатов к окислению водным йодом и одновременной нестабильностью в щелочных условиях после ацилирования Р—Н-связей, в процессе аммонолиза происходит расщепление олигонуклеотидной цепи в местах, содержащих Р—С-связи.

Ацилирование Р—Н-связей в твердофазном синтезе ведет к заметному снижению выхода целевого олигомера. В синтезе на полимерном носителе используются большие избытки реагентов — 10—20-кратный Р-компонента и 50—100-кратный конденсирующего реагента (относительно ОН-компонента, связанного с полимером), и возможность протекания побочных реакций и накопления побочных продуктов возрастает по сравнению с конденсацией в растворе. Особенно опасной становится реакция ацилирования Р—Н-связей в случае, когда пиридин содержит даже незначительные примеси сильных оснований. Так, при синтезе октамера $d[(\text{Tr})_7T]$ с проведением конденсаций в смеси ацетонитрил — пиридин (4 : 1), содержащей 0,5 % триэтиламина, несмотря на достаточно высокие выходы реакций конденсации (порядка 90—92 % на стадии), при гель-электрофорезе полосы целевого олигонуклеотида мы практически не наблюдали. Для выяснения этого факта был синтезирован декамер $d[(\text{Tr})_9T]$ и часть олигонуклеотида на носителе перед окислением обработали 0,25 М PivCl в смеси ацетонитрил — пиридин — триэтиламин (75 : 20 : 5) в течение 3 мин. Затем обе порции

окисляли, детритилировали и после аммонолиза реакционные смеси анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о расщеплении олигонуклеотида по ацилированным Р—Н-связям. Полная деградация олигонуклеотидов происходит и при введении стадии кэппирования уксусным ангидридом в присутствии метилимидазола, что также связано с ацилированием Р—Н-групп в олигонуклеотидной цепи в процессе синтеза.

Показано [6], что обработка ацилфосфоната (5) *n*-бутиламином в присутствии 1, 8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ена ведет к регенерации

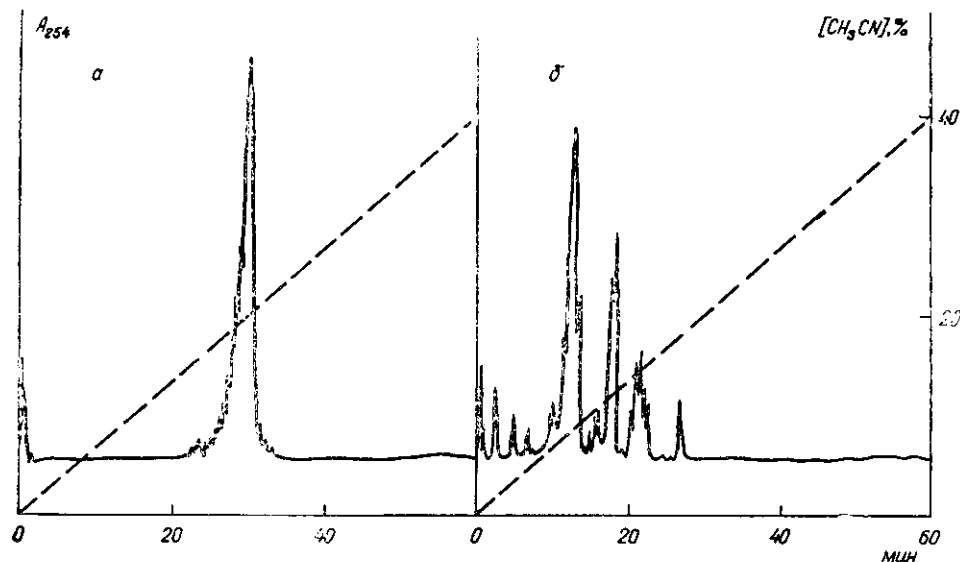


Рис. 3. Анализ обращеннофазовой ВЭЖХ реакционных смесей, содержащих декамер d(Tr)₅T, полученный Н-фосфонатным методом в обычных условиях (а) и с ацилированием Р—Н-связей перед окислением (б)

Н-фосфонатного диэфира (2). Однако это вряд ли применимо в твердофазном синтезе для отщепления Рiv-групп: во-первых, в этих условиях происходит отщепление олигонуклеотида от носителя вследствие разрыва сукцинатных связей и, во-вторых, динуклеозид-Н-фосфонаты при этом недостаточно стабильны. Поэтому ацилирование Р—Н-связей в процессе синтеза следует свести до минимума. Пиридин необходимо тщательно очищать от примесей сильных оснований или заменить его на хинолин, где скорость данного побочного процесса (как и других) в несколько раз ниже.

Таким образом, в настоящей работе исследованы основные побочные процессы, происходящие в Н-фосфонатном синтезе во время реакции межнуклеотидной конденсации. В связи с высокой скоростью конденсации их, как правило, можно не учитывать, особенно при реакции в растворе, однако они достаточно опасны в условиях твердофазного синтеза, где применяются большие избытки реагентов, и чаще всего проявляются при получении протяженных (20—30-звенных) последовательностей.

Авторы благодарят В. А. Ефимова (ИБХ РАН) за участие в обсуждении результатов.

Резюме. Вивчено основні побічні реакції, що супроводжують міжнуклеотидну конденсацію в Н-фосфонатному методі oligонуклеотидного синтезу, та досліджено їх кінетику в присутності ряду основ. Знайдено стійкі модифікації гетероциклічних основ півалоїлхлоридом. Показано, що ацилювання Р—Н-зв'язків призводить до розщеплення oligонуклеотидного ланцюга в ділянках, що містять Р—С-зв'язки. Виявлено, що швидкість побічних реакцій в декілька разів нижча у хиноліні, ніж в більш основному п'ридині.

Summary. Possible side-reactions during the internucleotide condensation in H-phosphonate oligonucleotide synthesis, such as OH-component and P-H bonds acylation and base modification, and their kinetics in presence of some bases have been studied. Stable modifications of heterocyclic bases by pivaloyl chloride were observed. It has been shown that P-H bonds acylation leads to oligonucleotide chain cleavage at acylated sites. The side-reactions rates were found to be several times lower in quinoline than in more basic pyridine.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hakura K., Rossi J. J., Wallace R. B. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides // *Annu. Rev. Biochem.*— 1984.— 53.— P. 323—356.
2. Ellis R. The application of synthetic oligonucleotides to molecular biology // *Pharm. Res.*— 1986.— 3, N 4.— P. 195—207.
3. Nucleoside H-phosphonates. III Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the hydrogenphosphonate approach / P. J. Garregg, I. Lindg, T. Regberg et al. // *Tetrahedron Lett.*— 1986.— 27, N 34.— P. 4051—4054.
4. Froehler B. C., Ng P. G., Matteuci M. D. Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates // *Nucl. Acids Res.*— 1986.— 14, N 13.— P. 5399—5407.
5. Regberg T., Stawinski J., Stromberg R. Nucleoside H-phosphonates. IX. Possible side-reactions during hydrogen phosphonate diester formation // *Nucleosides and Nucleotides.*— 1988.— 7, N 1.— P. 23—35.
6. Reaction of pivaloyl chloride with internucleotidic H-phosphonate diesters / E. Kuyt-Yeheskiely, M. Spierenburg, H. van der Elst et al. // *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*— 1986.— 105, N 11.— P. 505—506.
7. *Oligonucleotide synthesis: a practical approach* / Ed. M. J. Gait.— Oxford; Washington DS: IRL press, 1985.— 218 p.
8. Использование обращенно-фазовой хроматографии в олигонуклеотидном синтезе / В. В. Каташников, В. В. Самуков, Т. Н. Шубина, В. Ф. Ямшиков // *Биорг. химия.*— 1983.— 9, № 5.— С. 666—672.
9. Ефимов В. А., Дубей Н. Я., Модификация Н-фосфонатного метода синтеза олигонуклеотидов на полимерных носителях // Там же.— 1990.— 16, № 2.— С. 211—218.
10. Дубей Н. Я., Лямина Т. В., Федоряк Д. М. Универсальный вариант твердофазного Н-фосфонатного метода синтеза олигодезоксирибонуклеотидов // Там же.— № 11.— С. 1574—1576.
11. Ефимов В. А., Дубей Н. Я., Chakhmakhcheva O. G. NMR study and improvement of H phosphonate oligonucleotide synthesis // *Nucleosides and Nucleotides.*— 1990.— 9, N 3.— P. 473—477.
12. Novel activating and capping reagents for improved hydrogenphosphonate DNA synthesis / A. Andrus, J. W. Efcavitch, L. J. McBride, B. Gilusti // *Tetrahedron Lett.*— 1988.— 29, N 8.— P. 861—864.
13. Reese C. B., Skone P. A. The protection of thymine and guanine residues in oligodeoxyribonucleotide synthesis // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.*— 1984.— N 66.— P. 1263—1271.
14. Adamsiak R. W., Biata E., Skalski B. New ionic side-products in oligonucleotide synthesis: formation and reactivity of fluorescent N-(purin-6-yl)pyridinium salts // *Nucl. Acids Res.*— 1985.— 13, N 8.— P. 2989—3003.
15. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов Н-фосфонатным твердофазным методом в шприце / Ю. В. Даньков, Н. В. Батчикова, И. В. Скапцова и др. // *Биорг. химия.*— 1988.— 14, № 5.— С. 615—620.
16. Diphenylcarbamoyl and propionyl groups: a new combination of protecting groups for the guanine residue / T. Kamimura, G. Tsuchiya, K. Koura et al. // *Tetrahedron Lett.*— 1983.— 24, N 27.— P. 2775—2778.
17. A general procedure to convert H-phosphonate mono- or diesters of nucleic acids into valuable phosphate di- or triesters / E. de Vroom, M. L. Spierenburg, C. E. Dreef et al. // *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*— 1987.— 106, N 2.— P. 65—66.
18. Acylphosphonates: P-C bond cleavage of dialkyl acylphosphonates by means of amines. Substituent and solvent effects for acylation of amines / M. Sekine, M. Satoh, H. Yamagata, T. Hata // *J. Org. Chem.*— 1980.— 45, N 21.— P. 4162—4167.
19. Acylphosphonates. 4. Synthesis of dithymidine phosphonate: a new method for generation of phosphonate function via aroylphosphonate intermediates / A. Kume, M. Fujii, M. Sekine, T. Hata // *Ibid.*— 1984.— 49, N 12.— P. 2139—2143.

Ин-т биорг. химии и нефтехимии АН Украины,
Киев

Получено 15.05.91