

Препаративний синтез та деякі властивості дезоксирибозилсечовини, продукта окислювальної деградації ДНК

І. Я. Дубей, Л. В. Дубей

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Запропоновано ефективний метод препаративного синтезу 2'-дезоксирибозилсечовини, який включає окислення 5'-О-захищеного тимідину перманганатом калію та лужний гідроліз проміжного тимідингліколю. Вивчено можливість детекції залишків сечовини в складі олігонуклеотидів.

Вступ. Останнім часом інтенсивно вивчаються механізми окислювальної деградації нуклеїнових кислот (НК), яка спостерігається при опромінуванні біологічних об'єктів, у процесах старіння, при дії хімічних нуклеаз та деяких антибіотиків на НК та ін. [1–3]. Серед продуктів є й похідні сечовини. Залишки 2'-дезоксирибозилсечовини утворюються в ДНК при її окисленні деякими реагентами [1, 4–9] чи дії іонізуючої радіації [1, 10, 11] у результаті розщеплення гетероциклічних основ піримідинових нуклеозидів.

У рамках вивчення механізму дії хімічних нуклеаз на олігонуклеотиди нам необхідно було отримати 2'-дезоксирибозид сечовини як модель для вивчення можливості детекції похідних сечовини в складі ДНК. Однак вибір методів синтезу цього нуклеозидного аналога досить обмежений. Конденсація 2-дезоксирибози з сечовиною в присутності мінеральних кислот веде до утворення суміші α та β аномерів дезоксирибофуранозидів і піранозидів сечовини та N,N'-диглікозидів [12, 13]. О-Ацильований продукт отримано шляхом приєднання аміаку до відповідного 1-ізоціанату дезоксирибози [5]. З невисоким виходом виділено 3',5'-О-ацил-2'-дезоксирибозилсечовину шляхом перманганатного окислення 3',5'-О-ацильованого тимідину; при деблокуванні отримано суміш фура-

нозидів та піранозидів [13]. Недавній метод синтезу включає стадії окислення 5'-О-захищеного тимідину KMnO_4 , окислення інтермедіатів $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ та амоніліз отриманої суміші. Вихід 5'-захищеної дезоксирибозилсечовини становив 33 % [14, 15]. Ми спробували отримати продукт останнім методом і виявили, що утворюється складна суміш, в якій похідна сечовини не є основною складовою. Компоненти суміші мали близькі значення R_f , що ускладнювало хроматографічне розділення. Нами розроблено ефективніший метод синтезу 2'-дезоксирибозилсечовини.

Матеріали і методи. В роботі використані тимідин, 2'-дезоксиаденозин («Fluka», Швейцарія), 4-монометокситритилхлорид (MMTrCl), 2-карбоксібензальдегід («Aldrich», США), дихлороцтова кислота («Merck», Німеччина), смола Dowex 50W-X8 («Bio-Rad», США), НЕРЕС (4-(2-гідроксіетил)-піперазин-1-етансульфо кислота) («Reanal», Угорщина). Інші реактиви та розчинники вітчизняного виробництва.

Препаративну колонкову хроматографію проводили на силікагелі Silica gel 60 («Sigma», США). Тонкошарову хроматографію (ТШХ) здійснювали на пластинках Alugram Sil G/UV₂₅₄ («Macherey-Nagel», Німеччина) в системах хлороформ—метанол 9:1 (А) та 4:1 (Б). Нуклеозиди та інші похідні вуглеводів на пластинках ТШХ виявляли шляхом сприскування сумішшю анісовий альдегід—оцтова кислота—конц. H_2SO_4 —етанол (5:1:5:90) з наступ-

ним нагріванням при температурі 100—105 °С. Вуглеводмісні сполуки проявляються у вигляді синіх плям [16].

Похідні сечовини визначали за допомогою *п*-диметиламінобензальдегіду (DMABA, реагент Ерліха) [17]. Пластинки обробляли 1 %-м розчином реагенту в EtOH, сушили, витримували в парах конц. HCl протягом 30—40 с та нагрівали. Похідні сечовини утворюють плями жовтого кольору. Оскільки така обробка дає оранжево-жовті плями також із тритильованими компонентами за рахунок відщеплення MMTg-груп, для детекції залишків сечовини в тритильованих сполуках ми розробили наступний підхід. Після проведення ТШХ пластинку витримували протягом 30—40 с в парах HCl для повного детритильовання, відмічали відповідні плями й повторювали елюцію в системі А. Відщеплена MMTg-група легко відділяється від детритильованих похідних сечовини, які мають у цій системі нульову рухливість, і їх визначали обробкою пластинки реагентом DMABA. Спектри ПМР записували на спектрометрі Bruker AM-250 при 250 MHz в DMSO-d₆ з тетраметилсиланом як внутрішнім стандартом.

5'-О-монометокситритилтимідин (2). Нуклеозид 2 отримували методом [18] з деякими модифікаціями. Після тритильовання тимідину 1 л, 2 екв. MMTgCl в абсолютному піридині протягом ночі продукт 2 виділяли хроматографією на силікагелі в градієнті концентрації 0—3 % метанолу в хлороформі та кристалізували з бензолу (вихід 76 %). R_f 0,65 (система А), $T_{\text{топл}}$ 104—106 °С (літ. 103—105 °С [18]).

N-(5-О-монометокситритил-2-дезоксид-Д-рибофуранозил)сечовина (4). *5'-О-захищений тимідин 2* (514 мг, 1 ммоль) розчиняли в 10 мл суміші ацетон—піридин (3:1). Протягом 20 хв порціями додавали KMnO₄ (324 мг, 2,05 ммоль) при перемішуванні. Реакційну суміш перемішували до повного зникнення вихідного нуклеозиду (близько 1 год, основний продукт з R_f 0,52 (система А)). Надлишок перманганату нейтралізували 10 % Na₂SO₃, осад відфільтровували та промивали ацетоном, фільтрат упарювали у вакуумі до невеликого об'єму (3—4 мл). Додавали 50 мл CHCl₃, водний шар відділяли, органічну фазу сушили Na₂SO₄ й упарювали у вакуумі. Залишок розчиняли в 40 мл суміші етанол—вода (3:1) і додавали розчин NaOH (200 мг, 5 ммоль) у 10 мл цього ж розчинника (кінцева концентрація NaOH 0,1 М).

Через 1 год до суміші додавали 10 мл піридину й нейтралізували луг смолою Dowex 50W-X8 у піридиневій формі, уникаючи надлишку іонообмінника. Смолу швидко відфільтровували, проми-

вали етанолом, фільтрат упарювали у вакуумі. Надлишок піридину видаляли упарюванням залишку з толуолом (2 × 10 мл). Продукт 4 виділяли хроматографією на силікагелі в градієнті концентрації 0—7 % MeOH у хлороформі. Потрібну фракцію упарювали, продукт осаджували з хлороформу в гексан, висушували у вакуумі над P₂O₅.

Одержано 278 мг білого аморфного порошку (62 %). R_f 0,44 (А). ¹H ЯМР: δ 7,30—7,60 (м, 12H, Ar), 7,03 (д, 2H, J = 9,1 Гц, Ar), 6,67 (д, 0,25H, J = 9,9 Гц, NH, ізомер II), 6,65 (д, 0,75H, J = 9,9 Гц, NH, ізомер I), 5,91 (с, 1,5H, 3/4 NH₂, ізомер I), 5,60—5,80 (м, 1,5H, H-1' + 1/4 NH₂ (5,74, с, ізомер II)), 5,40 (д, 0,75H, J = 3,8 Гц, OH, ізомер I), 5,19 (д, 0,25H, J = 4,4 Гц, OH, ізомер II), 4,15 (м, 1H, H-3'), 4,03 (м, 0,75H, H-4', ізомер I), 3,86 (с, 3H, OCH₃), 3,80 (м, 0,25H, H-4', ізомер II), 3,04 (м, 2H, H-5', 5''), 2,34 (м, 0,75H, H-2', ізомер I), 1,95 (м, 0,25H, H-2', ізомер II), 1,85 (м, 0,25H, H-2'', ізомер II), 1,72 (м, 0,75H, H-2'', ізомер I). Аналіз, %: обчислено для C₂₆H₂₈N₂O₅: С 69,68; Н 6,30, N 6,25. Знайдено: С 69,24; Н 6,60; N 6,42.

N-(2-дезоксид-Д-рибозил)сечовина (5). 90 мг тритильованого глікозиду сечовини 4 (0,2 ммоль) розчиняли в 3 мл 3 %-го розчину CHCl₂COOH у CHCl₃. Через 5 хв до суміші додавали 20 мл діетилового ефіру, осад центрифугували й промивали ефіром (3 × 2 мл). Далі залишок розчиняли в 0,5 мл MeOH, нерозчинний матеріал відділяли центрифугуванням і осаджували продукт ефіром (5 мл). Осад центрифугували та промивали ефіром (3 × 2 мл). Повторювали осадження продукту з 0,3 мл MeOH у 5 мл ефіру. Після центрифугування осад знову промивали ефіром (3 × 1 мл) і висушували у вакуумі над P₂O₅. Вихід 2'-дезоксидрибозилсечовини 5 становив 26 мг (74 %). Білий аморфний порошок.

За даними ТШХ, у продукті повністю відсутні тритильовані компоненти та вільна сечовина. R_f 0 (А); 0,17 (Б). ¹H ЯМР: δ 6,78 (д, 0,5H, J = 9,5 Гц, NH), 6,63 (д, 0,25H, J = 9,6 Гц, NH), 6,58 (д, 0,25H, J = 10 Гц, NH), 5,86 (с, 0,2H, NH₂), 5,78 (с, 1H, NH₂), 5,72 (с, 0,3H, NH₂), 5,70 (с, 0,5H, NH₂), 4,75—5,70 (2H, група мультиплетів H-1' α та β аномерів фуранозидів та піранозидів, та дублет OH при 4,85 м. д. (J = 5,4 Гц)), 4,70 (д, 0,5H, J = 3,0 Гц, OH), 4,56 (д, 0,5H, J = 4,1 Гц, OH), 3,4—4,2 (м, 4H, H-3', H-4', H-5', 5''), 1,6—2,0 (м, 2H, H-2', H-2''). Аналіз, %: обчислено для C₈H₁₂N₂O₄: С 40,93; Н 6,87, N 15,91. Знайдено: С 41,23; Н 7,08; N 15,70.

Взаємодія глікозиду сечовини з 2-карбоксібензальдегідом. Сечовину 4 розчиняли в EtOH у різних концентраціях, додавали 1/4 об'єму 1 М

HEPES (pH 8) та 1,5 екв. 2-карбоксібензальдегіду в суміші етанол—1 М HEPES (4:1). Суміш витримували при кімнатній температурі чи при 50 °С і через певні проміжки часу аналізували за допомогою ТШХ у системі А.

Гідролітична стабільність дезоксирибозиду сечовини. 10 мМ розчин сечовини 5 в 10 %-й мурашиній кислоті (а) або 2 % HCl (б) витримували при кімнатній температурі. Через певні проміжки часу аліквоти реакційних сумішей аналізували за допомогою ТШХ у системі (Б), використовуючи відповідні реагенти для детекції похідних сечовини та дезоксирибози.

Результати і обговорення. Відомо, що основним продуктом окислення тимідину KMnO_4 в лужних умовах є так званий тимідингліколь (5,6-дигідрокси-5,6-дигідротимідин), який при подальшому окисненні дає продукти фрагментації [1, 3, 5—9, 19—21]. Це також основний стабільний продукт радіолізу тимідину [1, 3, 10, 11]. Утворення залишків тимідингліколю в складі ДНК відбувається при її окисленні тетраоксидом осмію [19, 20]. Похідні сечовини, які утворюються при окисненні чи радіолізі піримідинових нуклеозидів, є продуктами деградації відповідних гліколів [1, 8, 10, 11]. У розглянутому вище методі синтезу дезоксирибозилсечовини [14] застосовано розщеплення *цис*-діольної системи проміжного тимідингліколю 3 тетраацетатом свинцю з подальшим гідролізом інтер-

медіатів. У даному випадку гідроліз може протікати в кількох напрямках з утворенням низки продуктів, основним з яких (до 60 %) є N-(2-дезоксирибозил)формамід [14, 15, 21]. Однак в ряді робіт було показано, що лужний гідроліз самого тимідингліколю веде до утворення 2'-дезоксирибозилсечовини [6, 7, 9, 19, 20]. Так, залишки сечовини в ДНК було отримано обробкою останньої OsO_4 з наступним гідролізом при pH 12. На цих даних і базується запропонований нами метод синтезу дезоксирибозиду сечовини, що включає окислення захищеного тимідину та гідроліз проміжного тимідингліколю (схема).

Вихідною сполукою для проведення синтезу був 5'-O-монометокситритилтимідин 2, отриманий тритилуванням тимідину MMTrCl . Окислення 5'-захищеного тимідину перманганатом калію в суміші ацетон—піридин (3:1) проведено аналогічно до опублікованого методу [14, 21]. При цьому відбувається насичення подвійного зв'язку C5-C6 і втрата ароматичного характеру тиміну, що веде до різкого зменшення УФ-поглинання аглікону. Тритильна група в цьому випадку є зручним маркером для детекції компонентів на ТШХ (дає оранжеве забарвлення відповідних плям при проявленні пластинок кислотами; крім того, має власне УФ-поглинання).

Захист 5'-гідроксильної групи нуклеозиду одночасно робить неможливою ізомеризацію фура-

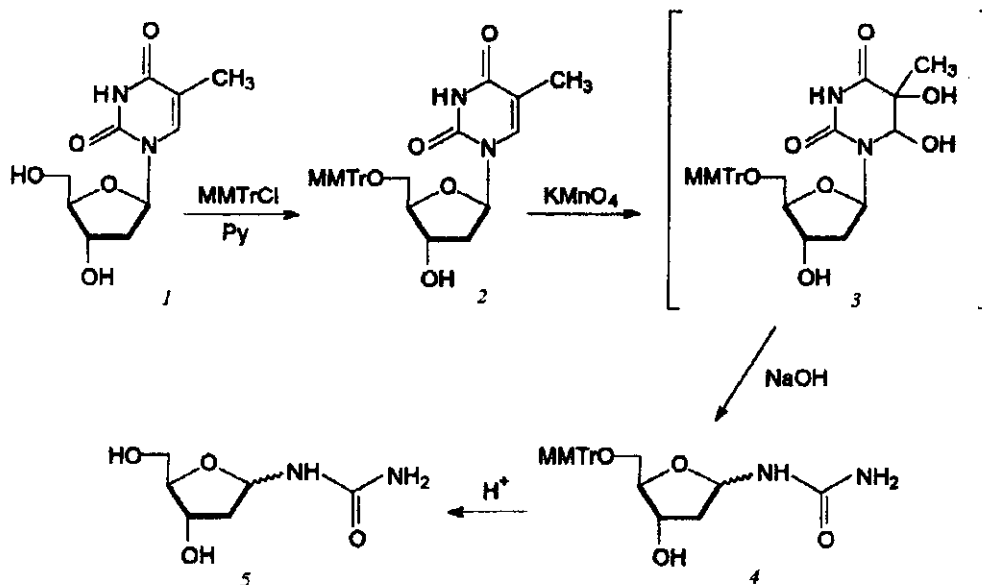


Схема синтезу 2'-дезоксирибозилсечовини

нозного кільця вуглеводу в 6-членний піранозний цикл, який відбувається, наприклад, при конденсації дезоксирибози з сечовиною. Крім того, за відсутності захисту 5'-гідроксилу в умовах реакції може відбуватись окислення останнього [8].

Після окислення 2 на ТШХ спостерігалось утворення одного основного компонента з R_f нижче вихідного нуклеозиду та кількох мінорних побічних продуктів. Далі проводили лужний гідроліз отриманої суміші інтермедіатів без виділення проміжного гліколю 3. В 0,1 М NaOH у водному етанолі швидко проходить реакція утворення N-глікозиду сечовини. Після гідролізу продуктів окислення тимідину одержано суміш, яку легко розділити і в якій дезоксирибозилсечовина є основним компонентом. Далі реакційну суміш нейтралізували катіонообмінною смолою Dowex 50W-X8 у піридинієвій формі. Треба мати на увазі, що при використанні значного надлишку смоли або при тривалому контакті реакційної суміші з нею спостерігається часткове детритилування продуктів, тому стадію нейтралізації слід проводити обережно. 5'-О-захищену дезоксирибозилсечовину 4 виділено хроматографією на силікагелі з виходом 62 %.

Структуру продукту було підтверджено за допомогою ЯМР-спектроскопії та елементного аналізу. В ПМР-спектрі 4 присутні сигнали двох ізомерів у співвідношенні 75:25, що відповідають α та β аномерам. Як описано в [14, 15], при синтезі з використанням окислення тетраацетатом свинцю теж отримано суміш двох ізомерів (70:30). Досить складно визначити конфігурацію кожного ізомеру за допомогою констант розщеплення $H1'-H2'$, оскільки протон $H1'$ проявляється в спектрі у вигляді складної групи сигналів при 5,6—5,8 м. ч. Сигнали $H1'$ кожного з ізомерів розщеплені на протонах $H2'$ та $H2''$, а також на протоні NH залишку сечовини, що веде до перекривання сигналів, і ця група додатково містить резонанс NH_2 одного з ізомерів. Додавання D_2O до розчину 4 в DMSO- d_6 призвело до зникнення в спектрі сигналів OH-груп ізомерів, однак резонанси NH та NH_2 лише дещо знизили інтенсивність, тобто не вдалося досягти потрібного спрощення спектра. Віднесення можна зробити лише на основі неповних даних. З доступних для вивчення неперекритих фрагментів групи сигналів $H1'$ можна визначити, що константи спин-спінової взаємодії (KCCB) $H1'-H2'$ та $H1'-H2''$ ізомеру I становлять 3,8 та 6,5 Гц, а для ізомеру — II 6,0 та 7,0 Гц, причому резонанс аномального протона ізомеру I знаходиться в слабшому полі відносно ізомеру II.

Відомо, що для β -нуклеозидів значення KCCB $H1'-H2'$ та $H1'-H2''$ однакові або близькі, тоді як

для α -аномерів їхні величини суттєво відрізняються і в останньому випадку сигнал $H1'$ частіше знаходиться в слабшому полі порівняно з відповідним β -аномером [22—24]. Можна припустити, що така закономірність зберігається і для N-глікозидів сечовини. В такому разі ізомер I є α -аномером, а ізомер II — β -аномером 4.

Для однозначного віднесення можна використати ядерний ефект Оверхаузера, але для цього група сигналів аномального протона була надто складною. Якщо припущення справедливе, то α -аномер дезоксирибозилсечовини є основним компонентом аномальної суміші, хоча продукт отримано з β -тимідину. В будь-якому випадку глікозид сечовини легко аномеризується на відміну від нуклеозидів, що містять ароматичний аглікон.

Частина захищеного глікозиду 4 була детритильована за допомогою кислотної обробки з утворенням 2'-дезоксирибозилсечовини 5. Спектр ПМР отриманого продукту достатньо складний, оскільки ця сполука з вільним 5'-гідроксильним здатна до ізомеризації в піранозидну структуру. В результаті утворена рівноважна суміш α та β аномерів 2'-дезокси-D-рибофуранозил- та -піранозилсечовини, що характерно для даної сполуки [10, 13]. У спектрі, як і у випадку попередника 4, добре проявлені сигнали NH та NH_2 аглікону та гідроксильних груп вуглеводного фрагмента. З інтенсивностей сигналів NH_2 -груп ізомерів в області 5,7—5,9 м. ч. можна визначити, що приблизне співвідношення ізомерів у суміші становить 2:3:5:10. У зв'язку із складністю спектра ідентифікації ізомерів не проводили.

Оскільки уреїдні фрагменти утворюються при окисленні НК, важливо було би знайти метод детекції залишків сечовини в складі олігонуклеотидів. Ми вивчили можливість застосування з цією метою специфічного мічення відомим реагентом на заміщені сечовини — 2-карбоксібензальдегідом [25]. Однак його реакція з 5'-О-захищеним глікозидом сечовини навіть при високій концентрації (100 мМ 4, 150 мМ альдегід у суміші етанол—1 М NEPES (pH 8), 4:1, 50 °C) протікала дуже повільно. Чутливість методу є недостатньою для використання у випадку НК з низькою концентрацією. До того ж 2-карбоксібензальдегід може реагувати також з амінами та амідами, як і інші реактиви, на N-заміщені сечовини. Справді, виявилось, що нуклеофільна аміногрупа дезоксицитидину досить легко взаємодіє з даним реагентом, що робить неможливим селективне мічення залишків сечовини. Таким чином, застосування даного підходу виявилось неефективним. Здається малоімовірним, що вдасться знайти реагент, який зможе

достатньо селективно взаємодіяти із залишками сечовини в присутності нуклеозидів, основи яких містять амідні фрагменти та екзоциклічні аміногрупи.

Іншою можливістю детекції уреїдних фрагментів могло би стати селективне відщеплення від олігонуклеотидів залишків сечовини з наступним їхнім визначенням відомими методами, в т. ч. з використанням мас-спектроскопії олігонуклеотидів. Як правило, N-глікозиди досить стійкі в лужних умовах, але чутливі до кислотного гідролізу. Описано, що залишки дезоксирибозилсечовини в складі ДНК стійкі до лужного гідролізу [4, 12]; так, повне розщеплення з утворенням сечовини досягається в 1 н. КОН за 1 год при 100 °С [4]. Нами було вивчено кислотний гідроліз дезоксирибозилсечовини 5 за різних умов. У 2 %-й НСІ повний гідроліз до дезоксирибози та сечовини відбувається за 4 год при кімнатній температурі, а в 10 %-й мурашиній кислоті за цей час він проходить приблизно на 10 %. За 24 год в 10 %-й НСООН розпадається 60–70 % дезоксирибозиду сечовини. Було також оцінено швидкість гідролізу в цих же умовах 2'-дезоксаденозину, який легко апуринізується. Виявилося, що dA гідролізується навіть швидше за 5: спостерігається повний гідроліз 2 %-ю НСІ за 3 год та близько 90 % розщеплення 10 %-ю НСООН за 24 год. Швидкість кислотного гідролізу дезоксирибозилсечовини є порівнянною із швидкістю розпаду дезоксиаденозину, що робить практично неможливим селективне відщеплення залишків сечовини в складі ДНК. Отже, методи специфічної детекції уреїдних фрагментів поки що не знайдені.

Таким чином, у даній роботі запропоновано зручний метод отримання 2'-дезоксирибозилсечовини, що базується на окисненні захищеного тимідину та подальшому лужному гідролізі проміжного тимідингліколю, та вивчено можливість визначення залишків сечовини, присутніх у складі ДНК.

Автори вдячні д-ру Ж. Пратвіель та Б. Менье (G. Pratiel, B. Meunier, Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS, Toulouse, France) за участь в обговоренні результатів роботи.

I. Y. Dubey, L. V. Dubey

Preparative synthesis and some properties of deoxyribosylurea, the product of DNA oxidative degradation

Summary

An efficient method for the preparation of 2'-deoxyribosylurea is proposed that includes the oxidation of 5'-O-protected thymidine with potassium permanganate and alkaline hydrolysis of intermediate thymidine glycol. The possibility of detection of urea residues in oligonucleotides has been studied.

И. Я. Дубей, Л. В. Дубей

Препаративный синтез и некоторые свойства дезоксирибозилмочевини, продукта окислительной деградации ДНК

Резюме

Предложен эффективный метод препаративного синтеза 2'-дезоксирибозилмочевини, включающий окисление 5'-O-защитенного тимидина перманганатом калия и щелочной гидролиз промежуточного тимидингликоля. Изучена возможность детекции остатков мочевины в составе олигонуклеотидов.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кнорре Д. Г., Федорова О. С., Фролова Е. И. Окислительная деградация нуклеиновых кислот // Успехи соврем. химии.—1993.—62, № 1.—С. 70—91.
2. Pratiel G., Bernadou J., Meunier B. Carbon-hydrogen bonds of DNA sugar units as targets for chemical nucleases and drugs // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*—1995.—34, N 7.—P. 746.
3. Burrows C. J., Muller J. G. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission // *Chem. Rev.*—1998.—98, N 3.—P. 1109—1151.
4. Jones A. S., Ross G. W., Takemura S., Thompson T. W., Walker R. T. The nucleotide sequence in deoxyribonucleic acids. Part VI. The preparation and reactions of permanganate-oxidized deoxyribonucleic acids // *J. Chem. Soc.*—1964.—N 1.—P. 373—378.
5. Goody R. S., Jones A. S., Walker R. T. The permanganate oxidation of cytosine derivatives // *Tetrahedron.*—1971.—27, N 1.—P. 65—69.
6. Iida S., Hayatsu H. The permanganate oxidation of thymidine and thymidylic acid // *Biochim. et biophys. acta.*—1970.—228.—P. 1—8.
7. Iida S., Hayatsu H. The permanganate oxidation of deoxyribonucleic acid // *Biochim. et biophys. acta.*—1971.—240.—P. 370—375.
8. Howgate P., Jones A. S., Tittensor J. R. The permanganate oxidation of thymidine // *J. Chem. Soc. (C).*—1968.—N 3.—P. 275—279.
9. Breimer L., Lindahl T. A DNA glycosylase from *Escherichia coli* that releases free urea from a polydeoxynucleotide containing fragments of base residues // *Nucl. Acids Res.*—1980.—8, N 24.—P. 6199—6211.
10. Cadet J., Teoule R. Chimie des acides nucleiques. I. Oxydation permanganique de la thymidine en solution aqueuse a pH 3,9 // *Bull. Soc. Chim. Fr.*—1974.—N 7—8.—P. 1565—1570.
11. Cadet J., Teoule R. Radiolyse gamma de la thymidine en solution aqueuse aeree. II. Caracterisation des produits stables // *Bull. Soc. Chim. Fr.*—1975.—N 3—4.—P. 885—890.
12. Benn M. H., Jones A. S. Glycosylureas. Part I. Preparation and some reactions of D-glycosylureas and D-ribosylureas // *J. Chem. Soc.*—1960.—N 10.—P. 3837—3841.
13. Jensen W. E., Jones A. S., Ross G. W. Glycosylureas. Part II. The synthesis and properties of 2-deoxy-D-ribosylureas // *J. Chem. Soc.*—1965.—N 4.—P. 2463—2465.
14. Guy A., Ahmad S., Teoule R. Insertion of the fragile 2'-deoxyribosylurea residue into oligodeoxynucleotides // *Tetrahedron Lett.*—1990.—31, N 40.—P. 5745—5748.
15. Baillet S., Behr J.-P. Deoxyribosylurea and deoxyribosylformamide oligonucleotides // *Tetrahedron Lett.*—1995.—36, N 49.—P. 8981—8984.
16. Koster H., Hoppe N., Kohli V., Kropelin M., Kaut H., Kulikowski K. Some improvements in the synthesis of DNA of biological interest // *Nucl. Acids Symp. Ser.*—1980.—N 7.—P. 39—60.

17. Hubener H. J., Bode F., Mollat H. J., Wehner M. Uber den quantitativen Nachweis von Harnstoff im Papier chromatogramm // Z. Physiol. Chem.—1952.—290.—P. 136—138.
18. Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G. Studies on polynucleotides. XXIV. The stepwise synthesis of specific deoxyribopolynucleotides (4). Protected derivatives of deoxyribonucleosides and new syntheses of deoxyribonucleoside-3' phosphates // J. Amer. Chem. Soc.—1963.—85, N 23.—P. 3821—3827.
19. Kow Y. W., Wallace S. S. Exonuclease III recognizes urea residues in oxidized DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82.—P. 8354—8358.
20. Ide H., Melamed R. J., Wallace S. S. Synthesis of dihydrothymidine and thymidine glycol 5'-triphosphates and their ability to serve as substrates for *Escherichia coli* DNA Polymerase I // Biochemistry.—1987.—26, N 3.—P. 964—969.
21. Guy A., Duplaa A.-M., Ulrich J., Teoule R. Incorporation by chemical synthesis and characterization of deoxyribosylformylamine into DNA // Nucl. Acids Res.—1991.—19, N 21.—P. 5815—5820.
22. Lemieux R. U. The configuration and conformation of thymidine // Can. J. Chem.—1961.—39, N 1.—P. 116—120.
23. Robins M. J., Robins R. K. Purine nucleosides. XI. The synthesis of 2'-deoxy-9- α - and - β -D-ribofuranosylpurines and the correlation of their anomeric structure with proton magnetic resonance spectra // J. Amer. Chem. Soc.—1965.—87, N 21.—P. 4934—4940.
24. Cleve G., Hoyer G.-A., Schultz G., Verbruggen H. NMR- und CD-Spektren von Pyrimidin-nucleosiden und ihren 2-Thioanaloga // Chem. Ber.—1973.—106, N 9.—S. 3062—3072.
25. Wheeler D. D., Young D. G., Erley D. S. Reactions of phthalaldehydic acid // J. Org. Chem.—1957.—22, N 5.—P. 547—556.

УДК 577.113.4:547.495.7
Надійшла до редакції 27.04.2000