



УДК 547.963.32 : 543.422.23

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВVIII \*. ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ  
3'-О-АЦЕТИЛТИМИДИН-5'-ФОСФАТА С ДИЦИКЛОГЕКСИЛКАРБОДИМИДОМ*Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В.**Институт органической химии Академии наук СССР  
Сибирского отделения, Новосибирск*

Методом импульсной спектроскопии  $^{31}\text{P}$ -ЯМР показано, что при взаимодействии 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфата (I) с ДЦК в пиридине последовательно образуются симметричный динуклеозидпирофосфат (II), тринуклеозидтрифосфат (III), тетра-нуклеозидтетрафосфат (IV). На более поздних стадиях накапливается активное производное мононуклеотида (нуклеозид-5'-метафосфат или его пиридинное производное) и N-[P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>-бис-(3'-О-ацетилтимидин-5')-пирофосфорил]-N, N'-дициклогексилмочевина (V).

При взаимодействии нуклеотида (I) с ДЦК в присутствии (Tr)T<sub>d</sub> в начальный период реакции зарегистрирована та же последовательность превращений, что и в отсутствие нуклеозидного компонента: (I) → (II) → (III). В незначительном количестве (10—15%) зарегистрированы соединения (IV), (V). В качестве главного промежуточного продукта, содержащего фосфодиэфирную группу, зарегистрирован P<sup>1</sup>-5'-О-тритилтимидин-P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>-бис-(3'-О-ацетилтимидин-5')-пирофосфат (C).

При избытке нуклеозидного компонента и ДЦК соединение (C) превращается в N-[P-5'-О-тритилтимидин-P-3'-О-ацетилтимидинфосфорил]-N, N'-дициклогексилмочевину (VI). Показано, что соединение (VI) образуется практически с количественным выходом при взаимодействии (Tr)T<sub>d</sub>pT<sub>d</sub>(Ac) с ДЦК.

Ранее методом импульсной спектроскопии  $^{31}\text{P}$ -ЯМР нами было исследовано взаимодействие мононуклеотида (I) с арилсульфохлоридами (ArSO<sub>2</sub>Cl) и показано, что конечный продукт превращения нуклеотида (I) в присутствии ArSO<sub>2</sub>Cl — активное производное мононуклеотида (B), содержит один атом фосфора [2, 3]. Это соединение взаимодействует с нуклеозидным компонентом с образованием тризамещенного пирофосфата (C) [4]. При использовании избытка ArSO<sub>2</sub>Cl конечным продуктом взаимодействия мононуклеотида и нуклеозидного компонента является тетразамещенный пирофосфат (D) [5].

Механизм реакции при использовании ДЦК в качестве конденсирующего реагента детально не изучен. В работе [6] высказано предположение, что главным продуктом реакции нуклеотида (I) с ДЦК является цикличес-

\* Сообщение VII см. [1].

Сокращения: ДЦК — N, N'-дициклогексилкарбодимид, ДЦМ — N, N'-дициклогексилмочевина. Остальные сокращения приведены в соответствии с рекомендацией IUPAC — IUB (1971). J. Mol. Biol., 55, 299. Например, (Tr) T<sub>d</sub> — 5'-О-тритилтимидин pT<sub>d</sub>(Ac) — 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфат.

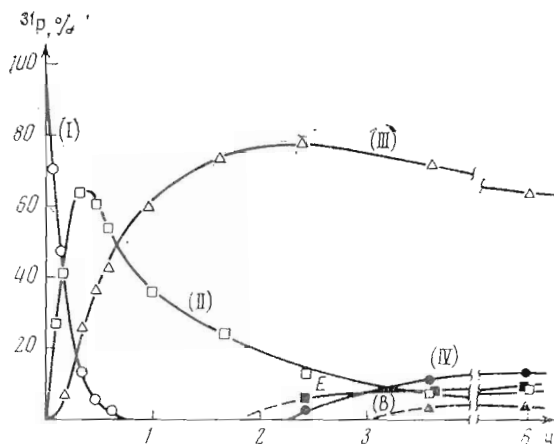


Рис. 1. Кинетические кривые образования продуктов (II)—(IV) и (B) при взаимодействии  $rT_d(As)$  (0,15M) с ДЦК (0,225M). *E* — избыточная интегральная интенсивность

кий тринуклеозидтриметафосфат, который вступает в реакцию с нуклеозидным компонентом с образованием межнуклеотидной связи.

С целью изучения механизма реакции мы исследовали взаимодействие мононуклеотида (I) с ДЦК в присутствии и в отсутствие нуклеозидного компонента с использованием метода импульсной спектроскопии  $^{31}P$ -ЯМР.

При взаимодействии  $rT_d(As)$  ( $\delta$  — 1,2 м.д.) с ДЦК в пиридине (см. схему 1) в спектрах  $^{31}P$ -ЯМР регистрируется последовательное образование дивалентного пирофосфата (II) (спиглет с  $\delta$  10,3 м.д.) и тривалентного линейного трифосфата (III) со спектром, состоящим из двух налегающих дублетов с центром при 11,5 м.д. и триплета с центром при 21,5 м.д. и  $J_{P-O-P}$   $17,5 \pm 1,4$  Гц в соотношении 2 : 1. На рис. 1 приведены кинетические кривые взаимодействия  $rT_d(As)$  с полутора эквивалентами ДЦК. При выдерживании реакционной смеси длительное время в спектрах  $^{31}P$ -ЯМР наблюдается появление дополнительных сигналов в области 23—24 и 11—12 м.д. Аналогичные сигналы появляются и при взаимодействии нуклеотида с большим избытком ДЦК (рис. 2). По аналогии с данными по взаимодействию нуклеотида (I) с  $ArSO_2Cl$  [3] эти сигналы отнесены к тетразамещенному тетрафосфату (IV), спектр которого должен состоять из двух сигналов равной интенсивности в области 11 и 24 м.д. Спектр реакционной смеси (рис. 2) может быть количественно разложен на сумму спектров соединений (III) и (IV). Таким образом, начальные стадии реакции мононуклеотида с ДЦК, а именно превращение (I)  $\rightarrow$  (II)  $\rightarrow$  (III)  $\rightarrow$  (IV), аналогичны стадиям, обнаруженным для взаимодействия нуклеотида (I) с  $ArSO_2Cl$ , и находятся в согласии со схемой, предложенной Кораной [6].

Практически одновременно с сигналами соединения (IV) в спектрах  $^{31}P$ -ЯМР регистрируется сигнал с  $\delta$  5,1 м.д. (рис. 2). Как было показано при исследовании взаимодействия вещества (I) с  $ArSO_2Cl$ , сигнал с таким химическим сдвигом имеет активное производное нуклеотида, которое содержит один атом фосфора, — соединение (B). Его структура окончательно не установлена. С имеющимися данными лучше всего согласуются структуры нуклеозид-5'-метафосфата или его пиридиниевого производного [2, 3]. По-видимому, здесь, как и при использовании  $ArSO_2Cl$ , соединение (B) образуется на первых стадиях реакции нуклеотида (I) с ДЦК, но при наличии в системе таких сильных нуклеофилов, как фосфаты (I) и (II), быстро вступает с ними в реакцию и не накапливается в реакционной смеси.

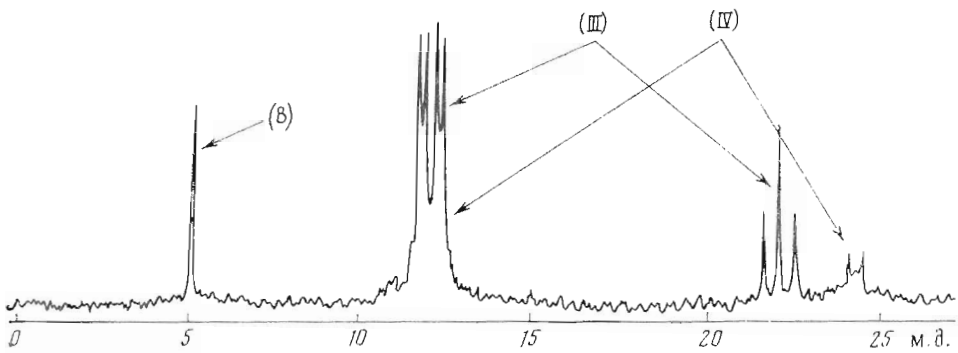


Рис. 2. Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР реакционной смеси, полученной при взаимодействии  $\text{rT}_d(\text{Ac})$  (0,15M) и ДЦК (1,5M) через 1 ч

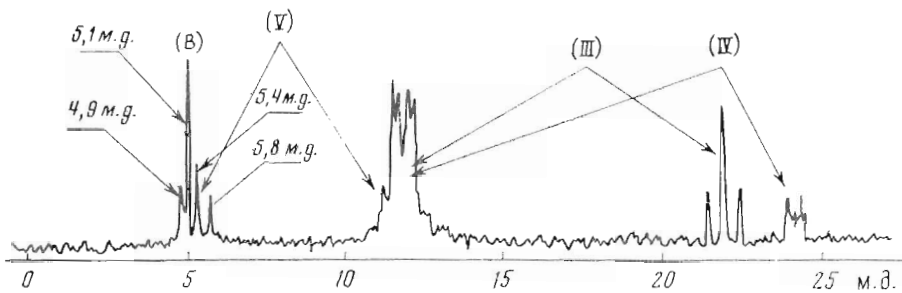
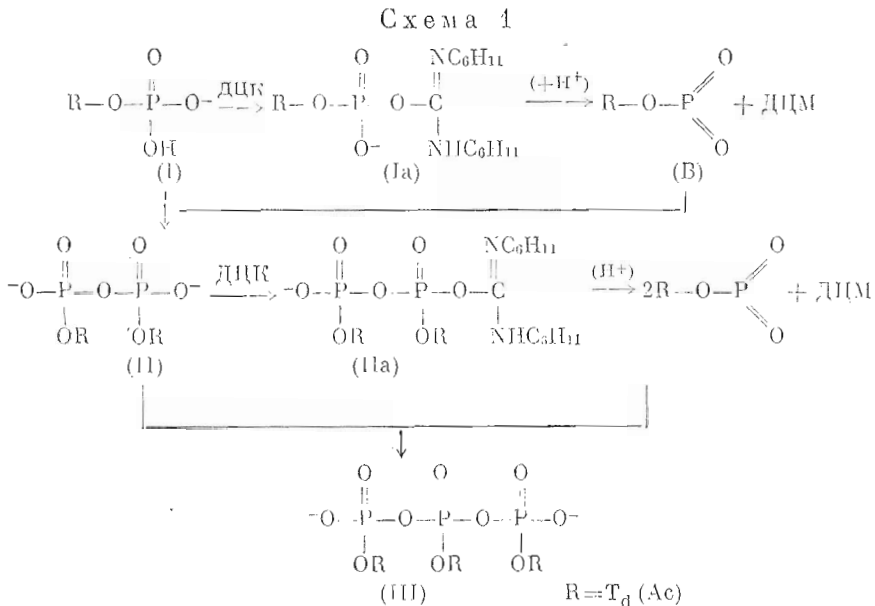


Рис. 3. Спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР реакционной смеси, полученной при взаимодействии  $\text{rT}_d(\text{Ac})$  (0,15M) и ДЦК (1,5M) через 3,3 ч

Схему начальных стадий реакции мононуклеотида (I) с ДЦК можно представить следующим образом:



Образование соединения (IV) можно представить как результат присоединения вещества (B) к трифосфату (III) или как результат взаимодействия (II) и (IIa). Данные рис. 1 говорят в пользу первого предположения, так как соединение (IV) регистрируется только после накопления значи-

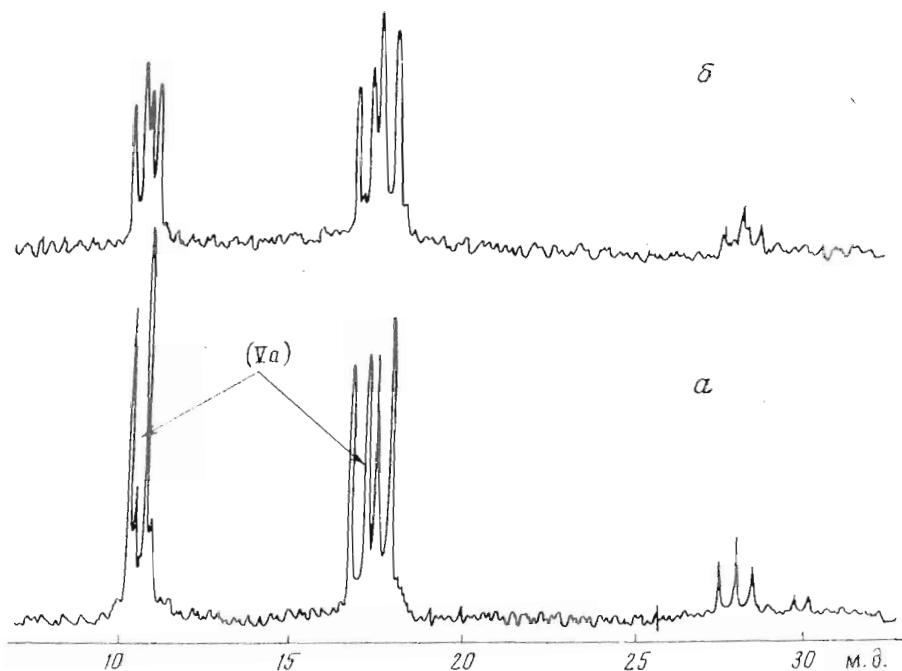


Рис. 4, *a* — спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР реакционной смеси, полученной при взаимодействии фенилфосфата (0,15 М) и ДЦК (1,5М) через 24 ч; *б* — спектр  $^{31}\text{P}$ -ЯМР той же реакционной смеси, записанный без гетероядерного подавления спин-спиновой связи  $^{31}\text{P}$ - $^{1}\text{H}$

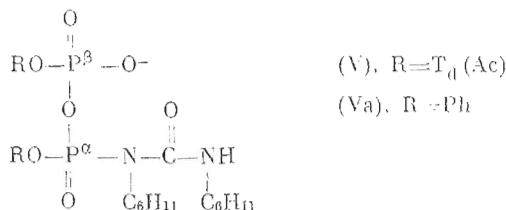
тельного количества трифосфата (III), когда концентрация пирофосфата (II) уже мала.

Ранее было показано, что при взаимодействии нуклеотида (I) с арилсульфохлоридом соединение (B) накапливается в качестве главного продукта реакции [3]. При реакции мононуклеотида с ДЦК количество образующегося (B) незначительно, и вскоре после регистрации соответствующего ему сигнала (5,1 м.д.) появляются новые сигналы в области 5—6 и 11—12 м.д. (рис. 3). Поскольку здесь спектры имеют сложный характер, аналогичная реакция была исследована на более простой модели — взаимодействии фенилфосфата с ДЦК. Было показано, что при этом, как и в случае взаимодействия мононуклеотида с ДЦК, наблюдается последовательное превращение фенилфосфата (синглет с  $\delta$  3,6 м.д.) в  $\text{P}^1$ ,  $\text{P}^2$ -дифенилпирофосфат (синглет с  $\delta$  15,7 м.д.) и  $\text{P}^1$ ,  $\text{P}^2$ ,  $\text{P}^3$ -трифенилтрифосфат, спектр которого (см. рис. 4, *a*) представляет собой дублет с центром при 17,7 м.д. и триплет с центром при 28,3 м.д. в соотношении 2 : 1 и  $J_{\text{P-O-P}}$   $17,6 \pm 1,4$  Гц. Затем в спектрах регистрируется сигнал мономерного производного ( $\text{B}_1 = \text{B}$ , при  $\text{R} = \text{Ph}$ ) (синглет с  $\delta$  10,5 м.д.) и наблюдается синхронный рост двух дублетов с центром при 10,6 и 17,2 м.д. в соотношении 1 : 1 и  $J_{\text{P-O-P}}$   $16,0 \pm 1,4$  Гц. Наличие в спектре (рис. 4, *a*) двух дублетов с константой расщепления, характерной для связи P-O-P, свидетельствует о присутствии в системе соединения с пирофосфатной связью и неэквивалентными атомами фосфора. Химический сдвиг одного из атомов фосфора ( $\text{P}^{\beta}$ ) близок к химическому сдвигу атома фосфора в симметричном пирофосфате, а второго ( $\text{P}^{\alpha}$ ) сдвинут в слабое поле на  $\sim 6$  м.д.

Поскольку при реакции мононуклеотида с  $\text{ArSO}_2\text{Cl}$  таких продуктов не наблюдается, можно предположить, что в реакционной смеси имеется продукт взаимодействия пирофосфата с ДЦК. Сдвиг сигнала в слабое поле на 4—10 м.д. характерен для эфиров фосфорной кислоты и их пирофосфатов при образовании связи P-N [7]. Такая же закономерность наблюдает-

ся и для нуклеотидных производных. Так, сигнал 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфоциклогексиламида (-4,9 м.д.) относительно сигнала  $pT_d(\text{Ac})$  (-1,2 м.д.) сдвинут в слабое поле на  $\sim 4$  м.д. [4]. Мы предположили, что в рассматриваемой системе соединением, содержащим одновременно пирофосфатную и P-N связи, является N-( $P^1$ ,  $P^2$ -дифенилпирофосфорил)-N, N'-дидицлогексилмочевина (Va) с сигналами для  $P^\alpha$  10,5 м.д. и для  $P^\beta$  17,2 м.д.

Запись спектров реакционной смеси без подавления спин-спиновой связи  $\{^1\text{H}\}$ - $^{31}\text{P}$  подтверждает правомерность отнесения сигналов. Из рис. 4, б видно, что только один из дублетов в слабом поле расщеплен, что указывает на наличие у атома  $P^\alpha$  заместителя с vicинальным протоном. Это согласуется с предлагаемой структурой содержащей группу атомов P-N-C-H.



При реакции нуклеотида (I) с ДЦК (рис. 3) одна группа сигналов регистрируется в области пирофосфатов (10-12 м.д.), а другая также смещена в слабое поле  $\sim$  на 6 м.д. Более сложный спектр в области 5 м.д. для соединения (V) по сравнению с (Va), по-видимому, обусловлен существованием соединения (V) в виде смеси диастереомеров. В этом случае для  $P^\alpha$  должно наблюдаться два дублета в области 5 м.д. В регистрируемом спектре (рис. 3) сигнал асимметрического атома фосфора представляет собой два налагающихся дублета, причем положение двух линий совпадает.

Совокупность полученных данных позволяет считать, что при реакции как мононуклеотида (I), так и фенилфосфата с ДЦК после образования линейных трифосфатов наряду с соединением (B) или ( $B_1$ ) наблюдается накопление дизамещенных N-пирофосфорил-N, N'-дидицлогексилмочевин (V) и (Va).

При большом избытке ДЦК сохраняется та же последовательность превращений (I)  $\rightarrow$  (II)  $\rightarrow$  (III)  $\rightarrow$  (IV), что и при полуторном избытке (рис. 5). Таким образом, по данным спектроскопии  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, продуктами превращения мононуклеотида (I) при взаимодействии с 1,5-10 эквивалентами ДЦК являются соединения (II), (III), (IV), (V) и (Va), причем пирофосфат (II) в конечной реакционной смеси отсутствует (рис. 4 и 5).

Полученные результаты не могут рассматриваться как полные, поскольку в области 10-13 м.д. наблюдается до 10-20% избыточной интегральной интенсивности (E), отнесение которой затруднено и требует специального исследования.

В спектрах ЯМР не обнаружены сигналы в области 20-25 м.д., которые могли бы быть отнесены к тринуклеозидтриметафосфату, постулированному Кораной [6].

Далее было исследовано взаимодействие нуклеотида (I) с ДЦК в присутствии нуклеозидного компонента (трехкомпонентная система). На рис. 6 приведены кинетические кривые реакции  $pT_d(\text{Ac})$  с двумя эквивалентами ( $\text{Tr}$ ) $T_d$  и 10 эквивалентами ДЦК. Видно, что в начальный период, как и в случае двухкомпонентной системы, наблюдается последовательное превращение (I)  $\rightarrow$  (II)  $\rightarrow$  (III). Соединения (IV) и (V) образуются в существенно меньшем количестве (10-15%).

В отличие от двухкомпонентной системы в исследуемых условиях наблюдается достаточно быстрое расходование соединений (III) и (IV).

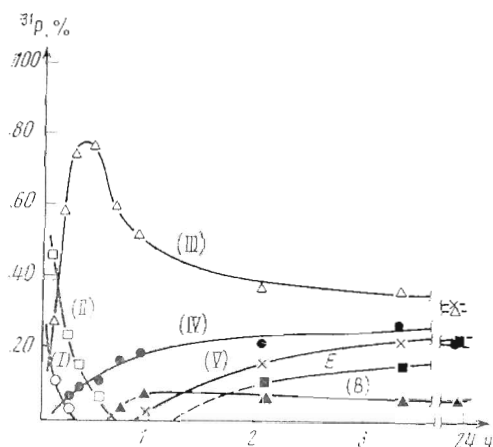


Рис. 5. Кинетические кривые образования продуктов (II)—(V) и (B) при взаимодействии  $pT_d(As)$  (0,15M) с ДЦК (1,5M)

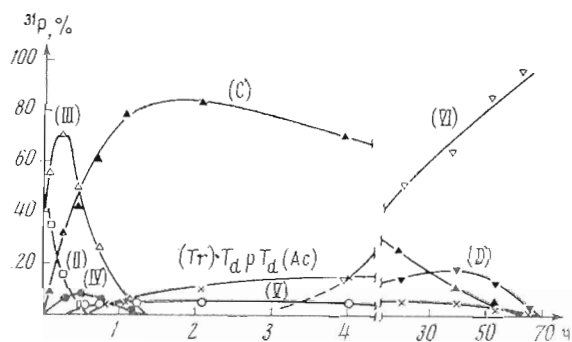


Рис. 6. Кинетические кривые образования (II)—(VI), (C), (D) и  $(Tr)T_d p T_d(As)$  при взаимодействии  $pT_d(As)$  (0,15M),  $(Tr)T_d$  (0,3 M) и ДЦК (1,5M)

Через 2 ч от начала реакции их сигналы не регистрируются. В спектрах  $^{31}P$ -ЯМР наблюдается быстрый рост интенсивности сигналов в области 10—13 м.д. Из рис. 6 видно, что через 70 мин здесь концентрируется ~ 80% всей интенсивности. Данные о положении и интенсивности отдельных линий основного мультиплета (10—13 м.д.) представлены в табл. 1, в которой для сравнения также приведены значения  $\delta$  и соотношения интенсивностей линий для мультиплета тризамещенного пирофосфата (C)—  $P^1-5'-O$ -триэтилтимидин- $P^1$ ,  $P^2$ -бис-(3'-O-ацетилтимидин-5')-пирофосфата, образующегося при взаимодействии соединения (B) с  $(Tr)T_d$ , а также при взаимодействии (B) с  $(Tr)T_d p T_d(As)$  [4]. Видно, что положение компонент спектра вещества (C) и рассматриваемого мультиплета полно-

Таблица 1

Химические сдвиги и соотношения интенсивностей линий мультиплета в области 10—13 м.д., зарегистрированного через 70 мин от начала реакции 0,15M  $pT_d(As)$  с 0,3M  $(Tr)T_d$  и 1,5M ДЦК

Химические сдвиги линий, м.д.	Данные настоящей работы	10,7	11,1	11,5	12,0	12,5
	Соединение (C) по данным работы [4]	10,7	11,1	11,5	12,0	12,5
Интенсивности линий, % $^{31}P$	Данные настоящей работы	16,5	31,6	20,3	23,4	8,2
	Соединение (C) по данным работы [4]	10,7	35,6	21,9	23,9	7,8

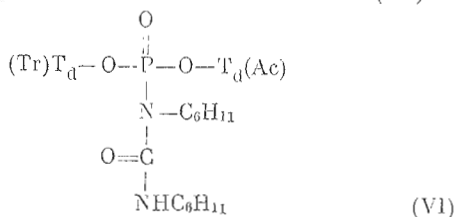
стью совпадает. Близки и интенсивности линий сигналов. Некоторое их несоответствие, по-видимому, обусловлено наложением сигналов соединений (С) и (V).

Наличие тризамещенного пирофосфата в системе подтверждено его химическими превращениями. При обработке соединения (С) амином или водой должны образоваться эквивалентные количества  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$  и амида  $\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$  или  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$  и  $\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$  соответственно [4]. Добавление морфолина к реакционной смеси, содержащей 60% (С), 10% (V), 20% (III), 10% (IV), приводит к образованию 30%  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$ , 43% морфолида  $\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$ , 27% (II) ( $\delta$  1,5; -6,2; 10,3 м.д. соответственно), а добавление воды — к 26%  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$ , 37% (I) и 37% (II). Избыток нуклеотида (I), морфолида  $\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$  и наличие пирофосфата (II), по-видимому, связаны с превращениями других соединений, присутствующих одновременно с (С) в исходной реакционной смеси.

Таким образом, одним из главных промежуточных продуктов при образовании межнуклеотидной связи является тризамещенный пирофосфат(С).

Помимо сигнала соединений (С) и (V) в спектрах регистрируется до 10% сигнала с  $\delta$  1,3 м.д. и до 15% сигнала с  $\delta$  13,8 м.д. По аналогии с данными работы [5] эти сигналы отнесены соответственно к  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$  и тетразамещенному пирофосфату (D).

Конечным продуктом взаимодействия  $\text{pT}(\text{Ac})$  и двух эквивалентов  $(\text{Tr})\text{T}$  в присутствии избытка ДЦК является соединение (VI), имеющее в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР два одиночных сигнала с  $\delta_1$  -4,8 м.д. и  $\delta_2$  -5,2 м.д. Это же соединение образуется при взаимодействии  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$  с ДЦК, и его сигналы относительно сигнала  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$  сдвинуты в слабое поле на  $\sim 6$  м.д.  $E_f$  образующегося соединения равно нулю. При добавлении к реакционной смеси воды соединение (VI), по данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР, хроматографии на бумаге и электрофореза, через 3 сут количественно превращается в исходный  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$ . Совокупность полученных данных позволяет приписать этому соединению структуру N-(P-5'-O-гритилтимидин-Р-3'-О-ацетилтимидинфосфорил)-N,N'-дигидрогексилмочевины (VI):



Наличие двух одиночных линий в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР связано с существованием соединения (VI) в виде двух диастереомеров. По данным работ [8, 9], сигналы атомов фосфора, находящихся в разных диастереомерах, имеют различные химические сдвиги в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР.

Образование производных N-фосфорилдигидрогексилмочевин было показано для нуклеозид-2'(3'-)-циклофосфатов [10, 11]. Образование N-фосфорилмочевины по фосфодиэфирной группе зарегистрировано впервые. Соединение (VI) образуется в незначительном количестве, если в реакционной смеси имеется недостаток  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}$  (табл. 2).

Из данных табл. 2 следует, что при недостатке  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}$  в системе главным конечным продуктом взаимодействия является соединение (С). Этот факт позволяет считать, что соединение (VI) образуется не из (С), а непосредственно из  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}\text{pT}_{\text{d}}(\text{Ac})$ , который получается при взаимодействии вещества (С) с избытком  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}$ .

Таблица 2

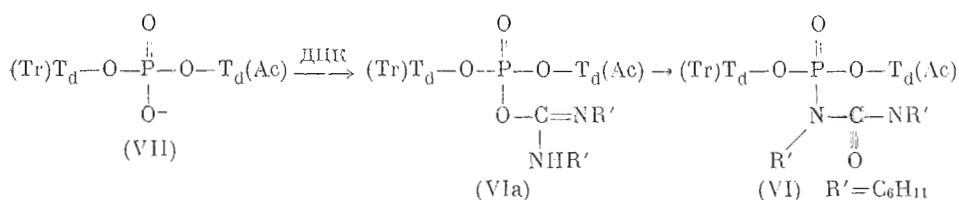
Состав реакционной смеси (%  $^{31}\text{P}$ ) при взаимодействии 0,15М мононуклеотида (I), 0,075М  $(\text{Tr})\text{T}_{\text{d}}$  и 1,5М ДЦК через 2 и 24 ч от начала реакции

м.д.	Соединение	2 ч	24 ч
-4,8}	(VI)	5,5	9,4
-5,2}			
5-6 }	(V)	32,5	25,4
10-12}			
10-13	(С)	62	62
-2,4	Не идентифицировано	—	3,2

В литературе образование N-производных ацилдициклогексилмочевины связывают с изомеризацией промежуточно образующегося O-производного изомочевины или с реакцией последнего с кислотой с образованием ангидрида, который затем вступает в реакцию с дициклогексилмочевиной [10].

Нами показано, что добавление дициклогексилмочевины к ангидриду (D), полученному из (Tr)T<sub>d</sub>P<sub>d</sub>(Ac) с помощью полистиролсульфохлорида согласно [12], не привело к образованию соединения (VI), что может свидетельствовать в пользу протекания изомеризации по схеме 2.

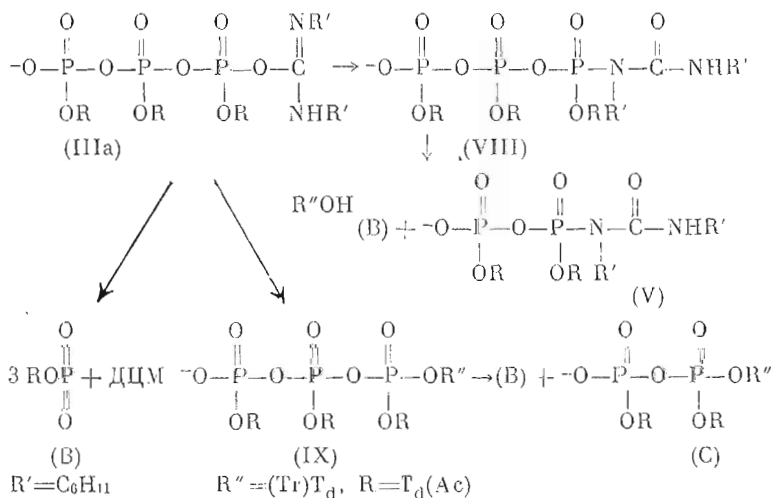
Схема 2



Такую изомеризацию активных производных диэфиров можно понять, исходя из того, что в отсутствие достаточно сильных нуклеофилов она является единственно мыслимым процессом превращения (VIa), помимо обратной реакции с образованием ДЦК и диэфира, в отличие от аналогичных производных моноэфиров (Ia) и (IIa), которые могут элиминировать вещество (B) (см. схему 1).

Полученные нами данные не позволяют построить достаточно полную схему реакций, протекающих с участием ДЦК, в особенности в части, касающейся накопления соединения (V) и путей образования вещества (C) — главных продуктов превращения мононуклеотида (I) соответственно в отсутствие и в присутствии нуклеозидного компонента. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что и в том и другом случае накопление их начинается после стадии образования триполифосфата (III). Один из возможных вариантов — образование их из активного производного (IIIa) по схеме 3:

Схема 3





Если допустить, что скорость элиминации метафосфата (В) из соединения (IIIa) понижена по сравнению с аналогичным процессом для (IIa) и (Ia), то можно представить, что на уровне этого производного возможны либо изомеризация с образованием продукта (VIII), либо реакция с (Tr)T<sub>d</sub> с образованием соединения типа (IX). Соединения (VIII) и (IX) должны элиминировать (В), давая соответственно вещества (V) и (С).

На более поздних стадиях по мере появления метафосфата (В) должно происходить его взаимодействие с (Tr)T<sub>d</sub> с образованием пирофосфата (С) [4] и, возможно, с ДЦМ с образованием продукта (V).

Однако для того, чтобы отдать предпочтение какому-либо из этих двух путей образования соединений (С) и (V), необходимы детальнее кинетические исследования.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфат, 5'-О-трифитилтимидин и 5'-О-трифитилтимидил-(3' → 5')-3'-О-ацетилтимидин [13]. Морфолин марки х.ч. перегоняли над щелочью. Синтез осуществляли при 28° в пиридине, содержащем не более 0,05% воды. Пиридин хранили над молекулярными ситами типа 4А.

Электрофоретическую подвижность соединений определяли  $E_f$  относительно pT<sub>d</sub>(Ac) в 0,02 М триэтиламмонийбикарбонате при pH 7,5, используя аппарат для высоковольтного горизонтального электрофореза (Венгрия). Для хроматографии использовали бумагу FN-1 и систему этанол — 1 М ацетат аммония (5 : 2), pH 7,5.

Спектры <sup>31</sup>P-ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-НС 12 (фирма «Bruker-Physik AG», ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены в м.д. относительно 85% Н<sub>3</sub>Р<sub>4</sub> как внешнего стандарта. Спектры записывали с гетероядерным подавлением спин-спиновой связи <sup>31</sup>P-{<sup>1</sup>H}. Диаметр используемой ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,5 мл. Концентрация <sup>31</sup>P во всех экспериментах 0,15 М. Детали эксперимента приведены в работе [3]. Количественную обработку результатов проводили по интегральным кривым, принимая за 100% сумму интегральных интенсивностей по всему спектру.

*Оценка интегральных интенсивностей сигналов индивидуальных соединений в реакционной смеси.* За интенсивность сигнала соединения (III) принимали утроенную интенсивность триплета в области 21,5 м.д., а за интенсивность сигнала соединения (IV) — удвоенную интенсивность сигнала в области 23,6 м.д.

Поскольку сигнал соединения (В) налагается на один из компонентов (4,9 м.д.) сигнала атома Р<sup>α</sup> соединения (V), оценку интегральных интенсивностей сигналов соединений (В) и (V) ( $I_B$  и  $I_V$ ) проводили следующим образом: из общей интенсивности компонента при 4,9—5,1 м.д. вычитали интенсивность компонента сигнала Р<sup>α</sup> при 5,8 м.д. (см. рис. 3), эту разность считали  $I_B$ ; из общей интенсивности всего мультиплета в области 5 м.д. вычитали  $I_B$  и осадок принимали равным  $I_{V, P^{\alpha}}$ . Величину, равную  $2 \times I_{V, P^{\alpha}}$ , принимали за  $I_V$ .

Наличие избыточной интенсивности ( $E$ ) в области 11—13 м.д. определяли, вычитая из суммарной интенсивности сигнала в этой области интенсивность крайних атомов фосфора в соединениях (III) и (IV) (удвоенную интенсивность триплета в области 21,5 м.д. и интенсивность сигнала в области 23,6 м.д. соответственно) и интенсивность сигнала в области 5 м.д. (за исключением  $I_B$ ).

Идентификацию pT<sub>d</sub>(Ac), O[pT<sub>d</sub>(Ac)]<sub>2</sub>, (Tr)T<sub>d</sub>pT<sub>d</sub>(Ac), соединений (В) и (D) проводили по спектрам <sup>31</sup>P-ЯМР, основываясь на результатах работ [3, 5].

Авторы выражают глубокую благодарность чл.-кор. Д. Г. Кнорре за постоянный интерес к работе и участие в обсуждении результатов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кнорре Д. Г., Левина А. С., Шубина Т. Н. (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, вып. 3, 118—128.
2. Knorre D. G., Lebedev A. V., Levina A. S., Rezvukhin A. I. and Zarytova V. F. (1974) *Tetrahedron*, **30**, 3073—3079.
3. Зарьтова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 2, вып. 1, 85—96.
4. Зарьтова 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.
5. Зарьтова 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.
6. Weimann G., Khorana H. G. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 4329—4341.
7. Nielson M. L., Pustinger J. V. (1964) *J. Phys. Chem.*, **68**, 152—158.
8. Зарьтова 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.
9. Лебедев А. В., Резвухин А. И. (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 4, вып. 2, 149—154.
10. Smith M., Moffatt J. G. and Khorana H. G. (1958) *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 6204—6212.
11. Khorana H. G., Dekker C. A. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 3522—3527.
12. Зарьтова В. Ф., Кнорре Д. Г., Потапов В. К., Резвухин А. И., Туркин С. И., Шабарова Э. А. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 9, 152—155.
13. Gilham P. T., Khorana H. G. (1958) *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 6212—6222.

Поступила в редакцию  
30.VII.1975

### INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF THE CHEMICAL SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES. VIII. THE INTERMEDIATES IN THE REACTION OF 3'-O-ACETYLTHYMIDINE 5'-PHOSPHATE WITH DICYCLOHEXYLCARBODIIMIDE

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

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

The interaction of 3'-O-acetylthymidine 5'-phosphate (I) with dicyclohexylcarbodiimide (DCC) was studied by the pulsed NMR-<sup>31</sup>P spectroscopy. It was shown that I converts sequentially to the corresponding dinucleoside pyrophosphate (II), trinucleoside tripolyphosphate (III), and tetranucleoside tetrapolyphosphate (IV). At the later stages the formation of active monomeric nucleotide derivative and N-[P<sup>1</sup>,P<sup>2</sup>-bis-(3'-O-acetylthymidine-5')-pyrophosphoryl]-dicyclohexylurea (V) was observed. The interaction of I with DCC and 5'-O-tritylthymidine (Tr-T) at the initial stage of reaction leads to the same conversion of I in to II, III, and IV. The main product possessing phosphodiester group was shown to be P<sup>1</sup>-5'-O-tritylthymidine-P<sup>1</sup>,P<sup>2</sup>-bis-3'-O-acetylthymidine 5'-pyrophosphate (C). In the presence of the excess of Tr-T and DCC the compound C converted to N-[P<sup>1</sup>-5'-O-tritylthymidine-P<sup>1</sup>-3'-O-acetylthymidine-phosphoryl]-dicyclohexylurea (VI). It was found that (Tr)TdpTd(Ac) nearly quantitatively converts to VI in the reaction with DCC.