



УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ ФОСФОРНЫХ ЭФИРОВ 3'-С-МЕТИЛУРИДИНА

*Карпзйский М. Я., Михайлов С. Н., Шадыкова Н. Ш.,
Яковлев Г. И.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Синтезированы фосфорные эфиры 3'-С-метилуридина. Обработка 1-(2',3'-ди-О-ацетил-5'-О-бензоил-3'-С-метил-β-D-рибофуранозил)урацила смесью триэтиламин — МеОН приводит с хорошим выходом к 1-(5'-О-бензоил-3'-С-метил-β-D-рибофуранозил)урацилу, фосфорилированием которого 2-цианэтилфосфатом в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодимида с последующим деблокированием получили 2'(3')-фосфат 3'-С-метилуридина, превращенный далее в соответствующий нуклеозид-2',3'-циклофосфат. Аналогичное фосфорилирование 2',3'-О-этоксиметилен-3'-С-метилуридина дает 3'-С-метилуридин-5'-фосфат, исходя из которого синтезирован 3'-С-метилуридин-5'-трифосфат.

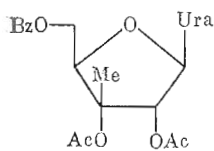
Настоящая работа является продолжением ранее начатых исследований по синтезу «полных» аналогов нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов [1—7] и посвящена синтезу фосфорных эфиров 3'-С-метилуридина с целью получения аналогов нуклеотидов — потенциальных субстратов или ингибиторов ряда ферментов метаболизма нуклеиновых кислот. Ранее нами были разработаны общие методы синтеза 3'-С-алкилнуклеозидов [5, 6, 8, 9].

При планировании синтеза аналогов нуклеотидов следовало учитывать низкую реакционную способность третичной 3-ОН-группы в реакциях ацилирования и фосфорилирования. Так, при бензоилировании метил-5-О-бензоил-3-С-метил-β-D-рибофуранозиды было показано, что при 20° С бензоилируется только 2-ОН-группа, а для получения 3-О-бензоильных производных необходимо нагревание реакционной смеси до 70° С [10]. В той же работе была обнаружена миграция 3-О-бензоильного остатка на соседнюю 2-ОН-группу, т. е. равновесие в данной системе сдвинуто в сторону 2-О-бензоата [10], а в случае 2-С-метилрибофуранозидов — в сторону 3-О-бензоата [11]. Эти данные, а также имеющиеся в работе Моффата с сотр. [12] указания на трудности фосфорилирования третичной 5'-ОН-группы в 5',5'-С-диметиладенозине свидетельствуют о том, что синтез 2',3'-циклофосфатов 3'-С-метилнуклеозидов является задачей не тривиальной.

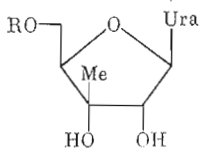
Для синтеза 2'(3')-нуклеотидов обычно используются 5'-О-третильные защитные группы, что обуславливает дополнительные стадии их введения и удаления. Мы решили использовать большую устойчивость О-бензоильной группы сравнительно с О-ацетильной группой к щелочному гидролизу [13] для синтеза 5'-О-бензоата (II) непосредственно из защищенного нуклеозиды (I).

Обработка нуклеозиды (I) [6] смесью триэтиламин — метанол в течение 20 ч при 20° С приводит к 5'-О-бензоату (II), выход 61%, и нуклеозиду (III), выход 16%. Нахождение бензоильной группы именно в 5'-О-положении подтверждается данными ПМР-спектров: протоны 5'a и 5'b образуют мультиплет в области 4,45 м.д., тогда как в нуклеозиде (III) эти протоны расположены в более сильном поле (3,56 м.д.). Слабопольный сдвиг этих протонов объясняется анизотропным влиянием 5'-О-бензоильной группы, в то время как химические сдвиги 2'-протонов в соединениях (II) и (III) практически одинаковы.

Фосфорилирование нуклеозиды (II) в стандартных условиях [14] 2-цианэтилфосфатом в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодимида при

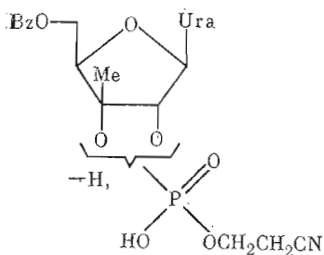


(I)

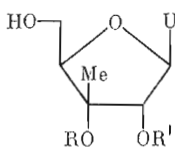
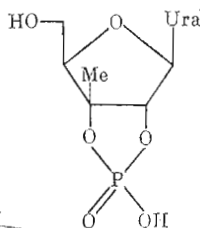


(II) R = Bz

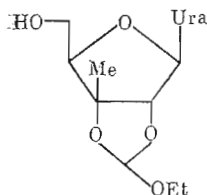
(III) R = H



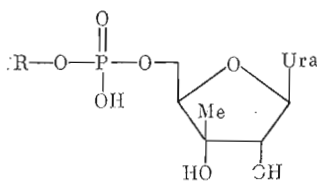
(IV)

(V) R = H, R' = PO₃H₂(VI) R = PO₃H₂, R' = H

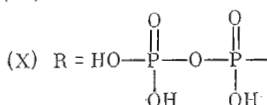
(VII)



(VIII)



(IX) R = H

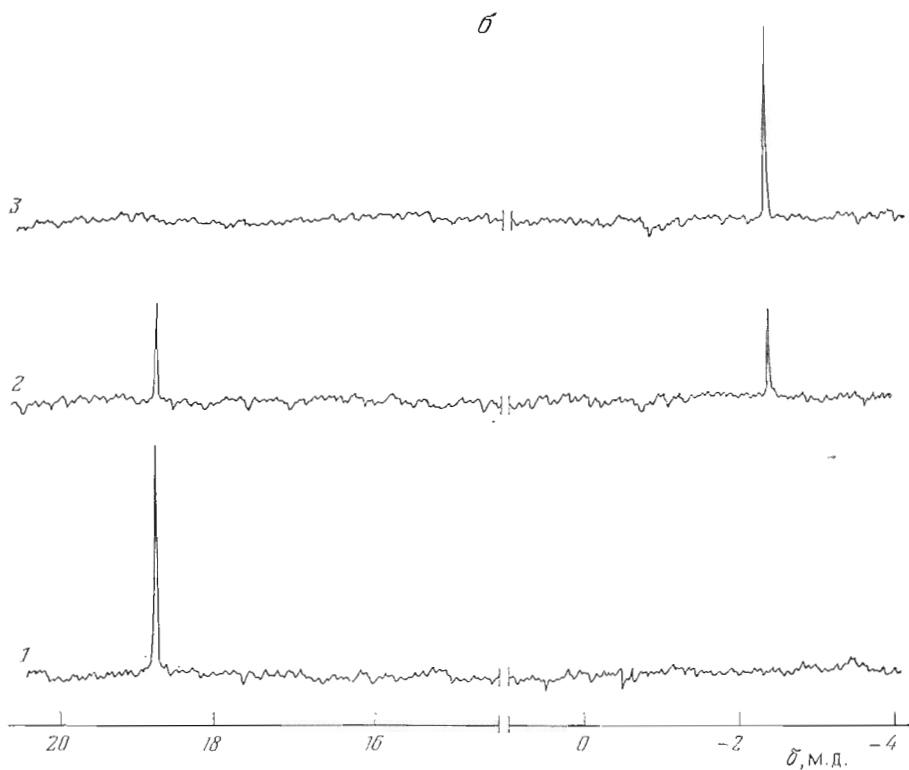
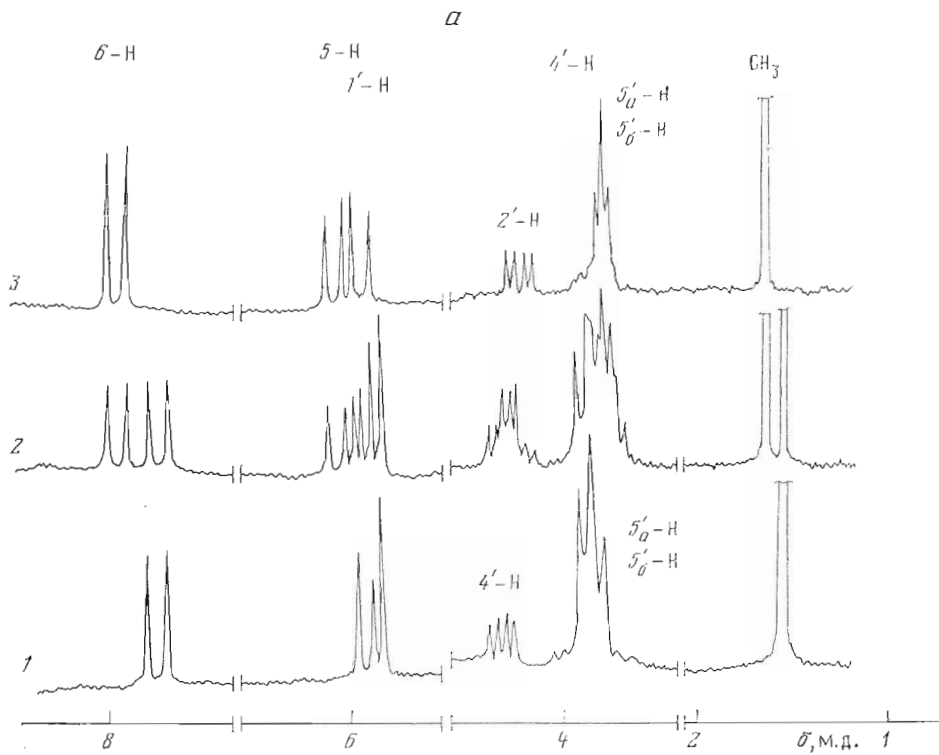


(X) R = HO-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-

20°С в пиридине с последующим разделением на DEAE-целлюлозе неожиданно привело к смеси соответствующих 2-цианэтиловых эфиров 5'-О-бензоил-3'-С-метилуридин-2'(3')-фосфатов с высоким выходом. Соотношение 2'- и 3'-изомеров, по данным ПМР-спектров, составляло 2:1. Кроме того, в смеси содержится 25% 2',3'-циклофосфата 5'-О-бензоил-3'-С-метилуридина, образующегося, по-видимому, в результате превращения 2-цианэтиловых эфиров нуклеотидов в условиях выделения.

Щелочным гидролизом эфиров (IV) получают нуклеотиды (V) и (VI), соотношение 2'- и 3'-изомеров, по данным ПМР-спектров, составляет 3:2. Циклизация смеси 2'- и 3'-нуклеотидов (V) и (VI) в стандартных условиях (N,N'-дициклогексилкарбодимид в метаноле при 20°С) [15] приводит с высоким выходом к циклофосфату (VII), структура которого подтверждена данными ПМР- и ³¹P-ЯМР-спектров. Наблюдаемые характерные для перехода от 2'(3')-фосфатов к 2',3'-циклофосфату уменьшение J_{1,2'} от 8 до 3,4 Гц в спектре ПМР [16] и сдвиг сигнала атома фосфора в слабое поле на ~21 м.д. в спектрах ³¹P-ЯМР [17] доказывают циклофосфатную структуру соединения (VII).

Непосредственное доказательство структуры циклофосфата (VII) было получено гидролизом этого соединения панкреатической рибонуклеазой. Реакцию проводили в D₂O в ампуле при периодической регистрации ³¹P-ЯМР- и ПМР-спектров (см. рисунок). Время полугидролиза в этих условиях оказалось равным 24 ч при 20°С, и единственным продуктом реакции являлся 3'-фосфат (VI). Независимое подтверждение структуры нуклеотида (VI) было получено его гидролизом до нуклеозида (III) и ортофосфорной кислоты эндонуклеазой S₁ — ферментом, обладающим 3'-нуклеотидазной активностью [18]. Интересно, что в ЯМР-спектрах соединения (VI) наблюдается необычно большая дальняя константа спин-спинового взаимодействия J_{P,2'-H}, равная 3,3 Гц, не наблюдавшаяся в природных 3'-нуклеотидах [16, 17].



Изменение интенсивности сигналов в спектрах ЯМР ^1H (α) и ^{31}P (β) во времени при гидролизе соединения (VII) панкреатической рибонуклеазой (см. «Экспер. часть»): 1 – исходный спектр циклофосфата (VII); 2 – через 24 ч после добавления фермента; 3 – спектр 3'-фосфата (VI)

Для изучения механизма действия полимеризующих ферментов был синтезирован 3'-С-метилуридин-5'-трифосфат (X). Ранее в работе Валтона с сотр. [19] было показано, что 3'-С-метилнуклеозиды проявляют противовирусную активность. Этот эффект, возможно, связан с терминованием синтеза РНК 3'-С-метилуридин-5'-трифосфатами, образующимися в клетке из 3'-С-метилнуклеозидов [20].

Предлагаемая методика синтеза нуклеозид-5'-фосфатов, использованная ранее для получения 5'-нуклеотидов и динуклеозидфосфатов на основе 5'-С-метилнуклеозидов [7, 21], заключается в фосфорилировании легкодоступных 2',3'-О-этоксиметиленовых производных нуклеозидов [22] 2-цианэтилфосфатом в присутствии дидиклогексилкарбодимидом или триэтилопропилбензолсульфохлорида с последующим удалением защитных групп.

Обработка нуклеозидов (III) триэтилортоформатом в диметилформамиде в присутствии кислоты приводила к соединению (VIII) и продукту, обладающему большей подвижностью при ТСХ — по-видимому, 5'-О-диэтоксиметил-2',3'-О-этоксиметилен-3'-С-метилуридину. Образование таких побочных продуктов ранее уже отмечалось [23]. Полученная смесь может быть легко разделена хроматографией на силикагеле. Фосфорилирование неразделенной смеси с последующей хроматографией на DEAE-целлюлозе и деблокированием давало 5'-фосфат с выходом 32% в расчете на исходный нуклеозид (III).

Реакцией нуклеотида (IX) с N,N'-карбонилдимидазолом с последующим взаимодействием с три-*n*-бутиламмониевой солью пиррофосфорной кислоты в стандартных условиях [24] получали 5'-трифосфат (X) с выходом 40%. Структура соединений (IX) и (X) подтверждена данными УФ-, ПМР- и ³¹P-ЯМР-спектрами, а также хроматографическими данными.

Результаты изучения полученных соединений в реакциях, катализируемых нуклеазами и полимеразами, будут сообщены в отдельной публикации.

Экспериментальная часть

Спектры ПМР регистрировали на спектрометре Varian XL-100 (США) с рабочей частотой 100 МГц. Химические сдвиги протонов приведены относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана для растворов в CDCl₃ и DMSO-*d*₆. Для растворов в D₂O измерения были выполнены с внутренним стандартом *трет*-бутанолом и пересчитаны относительно тетраметилсилана, принимая химический сдвиг *трет*-бутанола относительно последнего равным 1,27 м.д. Величины констант спин-спинового взаимодействия (*J*) измерены в герцах. Соотнесение сигналов проводилось с использованием двойного резонанса. ³¹P-ЯМР-спектры снимали на том же приборе в D₂O, используя 85% H₃PO₄ в качестве внешнего стандарта в условиях полного подавления спин-спинового взаимодействия с протонами. Химические сдвиги сигналов, находящихся в более слабом поле по отношению к стандарту, принимали положительными, а в более сильном поле — отрицательными. В спектрах ЯМР приняты следующие обозначения: с — синглет, д — дублет, т — триплет, к — квартет, м — мультиплет, ус — уширенный синглет, дд — дублет дублетов.

УФ-спектры снимали на приборе Specord UV VIS (ГДР). УФ-спектры полученных в работе фосфорных эфиров (V–VII), (IX) и (X) по положению максимумов и величинам молярных коэффициентов поглощения аналогичны спектрам соответствующих производных уридина: $\lambda_{\text{макс}}^{\text{рН } 1-7}$ 261 нм (ϵ 9000–10 000); $\lambda_{\text{макс}}^{\text{рН } 13}$ 261 нм (ϵ 7500–6800). Температуры плавления определены на приборе ТП (СССР) и не исправлены.

Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках Silufol UV₂₅₁ (СССР) в системах: CHCl₃ — EtOH, 95:5 (А); Pr'OH — конц. аммиак — вода, 7:1:2 (Б); на пластинках РI-целлюлозы (Merck, ФРГ) в 0,15 М KN₂PO₄ (В). В работе использовали также DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия), и сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция).

1-(5'-О-Бензоил-3'-С-метил-β-D-рибофуранозил)урацил (II) и 1-(3'-С-метил-β-D-рибофуранозил)урацил (III). Раствор 0,45 г (1 ммоль) 1-(2',3'-ди-О-ацетил-5'-О-бензоил-3'-С-метил-β-D-рибофуранозил)урацила (I) в 45 мл абс. MeOH и 5 мл сухого триэтиламина выдерживали 20 ч при 20° С (ТСХ демонстрировала отсутствие исходного продукта). Смесь упаривали в вакууме досуха, к остатку добавляли 20 мл воды и 20 мл этилацетата, слои разделяли, водный слой экстрагировали 20 мл этилацетата, а органический — 20 мл воды. Объединенные органические слои упаривали, к остатку прибавляли 20 мл эфира и оставляли на 16 ч при 0° С. Осадок отфильтровывали, промывали эфиром и сушили. Выход соединения (II) 220 мг (61%). Т. пл. 217–218° С. Найдено, %: С 56,17; Н 4,95. C₁₇H₁₈N₂O₇. Вычислено, %: С 56,35; Н 5,01. R_f 0,13 (А). УФ-спектр: λ_{макс}^{рН 7} 262, 235 нм. ПМР-спектр (DMSO-d₆, δ, м.д.): 11,23 ус (1H, NH, обменивается при добавлении D₂O), 8,06–7,58 м (5H, Bz), 7,58 д (1H, J_{6,5} 8,0 Гц, 6-Н), 5,87 д (1H, J_{1',2'} 8,0 Гц, 1'-Н), 5,51 д (1H, J_{5,6} 8,0 Гц, 5-Н), 5,48 д (1H, J_{2',OH} 6,3 Гц, 2'-ОН, обменивается при добавлении D₂O), 5,01 с (1H, 3'-ОН, обменивается при добавлении D₂O), 4,45 м (2H, 5'а-Н и 5'б-Н), 4,15 т (1H, J_{4',5',a}=J_{4',5',b}=5,0 Гц, 4'-Н), 3,97 дд (1H, J_{2',1'} 8,0 Гц, J_{2',OH} 6,3 Гц, 2'-Н, превращается при добавлении D₂O в дублет с J 8,0 Гц), 1,28 с (3H, Me).

Водные слои упаривали, к остатку добавляли 5 мл ацетона и оставляли на 16 ч при 0° С. Осадок отфильтровывали, промывали ацетоном, эфиром и сушили. Выход нуклеозида (III) 42 мг (16%). Т. пл. 197–199° С. Лит. данные [6]: т. пл. 197–198° С. После перекристаллизации из смеси спирт — вода т. пл. 213–214° С. ПМР-спектр (DMSO-d₆, δ, м.д.): 11,22 ус (1H, NH, обменивается при добавлении D₂O), 8,04 д (1H, J_{6,5} 8,0 Гц, 6-Н), 5,89 д (1H, J_{1',2'} 8,0 Гц, 1'-Н), 5,65 д (1H, J_{5,6} 8,0 Гц, 5-Н), 5,27 д (1H, J_{OH,2'} 6,5 Гц, 2'-ОН, обменивается при добавлении D₂O), 5,06 т (1H, J 4,0 Гц, 3'-ОН, обменивается при добавлении D₂O), 4,65 с (1H, 3'-ОН, обменивается при добавлении D₂O); 3,86 дд (1H, J_{2',1'} 8,0 Гц, J_{2',OH} 6,5 Гц, 2'-Н, превращается при добавлении D₂O в дублет с J 8,0 Гц), 3,81 т (1H, J_{4',5',a}=J_{4',5',b}=3,0 Гц, 4'-Н), 3,56 м (2H, 5'а-Н и 5'б-Н), 1,24 с (3H, Me). Характеристики соединения (III) (КД-, УФ-, ПМР-спектры в D₂O и хроматографические подвижности) идентичны ранее полученным в работе [6].

2-Цианэтиловый эфир 1-(5'-О-бензоил-3'-С-метил-β-D-рибофуранозил)урацил-2'(3')-фосфата (IV). Смесь 174 мг (0,48 ммоль) нуклеозида (II), 1 мл 1 М раствора 2-цианэтилфосфата в пиридине в 5 мл абс. пиридина упаривали в вакууме досуха, затем упаривали с абс. пиридином (3×10 мл), остаток растворяли в 5 мл абс. пиридина, добавляли 630 мг (3 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодимида и перемешивали 4 сут при 20° С. К смеси прибавляли 5 мл воды, смесь перемешивали 2 ч при 20° С, отфильтровывали дициклогексилмочевину и осадок промывали 20% водным пиридином (30 мл). Объединенные фильтраты экстрагировали эфиром (2×20 мл), водный слой разбавляли водой до объема ~200 мл и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (НСО₄⁻-форма, 200 мл). Колонку промывали водой (1 л) и элюировали NH₄НСО₃ в градиенте концентрации (0,0→0,2 М, общий объем 6 л). УФ-поглощающие фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5×20 мл) и лиофилизировали. Выход 220 мг. Элюирующая концентрация NH₄НСО₃ 0,05–0,06 М. R_f 0,55 (Б). УФ-спектр: λ_{макс}^{рН 7} 262, 235 нм. По данным ПМР-спектров в D₂O, в продукте наряду с 2'-фосфорным (6,20 д (1/2H, J_{1',2'} 8,0 Гц, 1'-Н) и 3'-фосфорным эфирами (6,08 д (1/4H, J_{1',2'} 8,0 Гц, 1'-Н)) в соотношении 2 : 1 содержится 25% 1-(5'-О-бензоил-3'-С-метил-β-D-рибофуранозил)урацил-2',3'-циклофосфата (5,85 д (1/4H, J_{1',2'} 3,2 Гц, 1'-Н)).

1-(3'-С-Метил-β-D-рибофуранозил)урацил-2'(3')-фосфат (V) и (VI). Раствор 200 мг соединения (IV) в 15 мл 1 н. NaOH выдерживали 20 мин при 20° С, смесь наносили на колонку с дауэксом 50 (H⁺-форма, объем 20 мл) и элюировали водой. В первой УФ-поглощающей фракции содер-

жались фосфаты (V) и (VI), а во второй — бензойная кислота. рН первой фракции доводили 1 M NH₄OH до 7,5, разбавляли водой до объема ~100 мл. наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO⁻-форма, объем 200 мл) и элюировали NH₄HCO₃ в градиенте концентрации (0,00→0,3 M, общий объем 6 л). УФ-поглощающие фракции, элюировавшиеся 0,11—0,12 M NH₄HCO₃, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5×10 мл) и лиофилизовали. Выход аммониевой соли нуклеотидов (V) и (VI) 90 мг, общий выход в расчете на исходный цуклеозид (II) 55%. УФ-спектры идентичны спектрам уридин-2'(3')-фосфата. R_f 0,16 (Б). Для уридин-2'(3')-фосфата R_f 0,14 (Б). ПМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 7,98 д (1H, J_{6,5} 8,0 Гц, 6-Н), 6,12 д (²/₅H, J_{1',2'} 8,0 Гц, 1'-Н, 2'-фосфат), 6,08 д (²/₅H, J_{1',2'} 8,0 Гц, 1'-Н, 3'-фосфат), 5,96 д (1H, J_{5,6} 8,0 Гц, 5-Н), 4,90—3,90 м (4H, 2'-Н, 4'-Н, 5'-а-Н и 5'-б-Н), 1,65 с (⁶/₅H, Me, 3'-фосфат), 1,45 с (⁶/₅H, Me, 2'-фосфат).

1-(3'-С-Метил-β-D-рибофуранозил)урацил-2',3'-циклофосфат (VII). Раствор 50 мг (0,134 ммоль) смеси нуклеотидов (V) и (VI) в 5 мл абс. MeOH упаривали в вакууме досуха, упаривали с абс. MeOH (2×5 мл), остаток растворяли в 3 мл абс. MeOH, добавляли 206 мг (1 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодимид и смесь перемешивали 16 ч при 20° С. К смеси прибавляли 100 мл воды, дициклогексимочевину отфильтровывали, осадок промывали водой (20 мл), объединенные фильтраты экстрагировали эфиром (2×20 мл), водный слой упаривали до объема ~100 мл и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻-форма, 200 мл). Колонку промывали водой (200 мл) и элюировали NH₄HCO₃ в градиенте концентрации (0,0→0,2 M, общий объем 6 л). УФ-поглощающие фракции, элюировавшиеся 0,05—0,06 M NH₄HCO₃, объединяли, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5×10 мл) и лиофилизовали. Выход аммониевой соли циклофосфата (VII) 39 мг (86%). R_f 0,53 (Б). Для уридин-2',3'-циклофосфата R_f 0,52 (Б). УФ-спектры соединения (VII) идентичны спектрам уридин-2',3'-циклофосфата. ПМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 7,81 д (1H, J_{6,5} 8,0 Гц, 6-Н), 5,94 д (1H, J_{5,6} 8,0 Гц, 5-Н), 5,91 д (1H, J_{1',2'} 3,4 Гц, 1'-Н), 4,30 дд (1H, J_{2',3'} 4,2 Гц, J_{4',5'} 6,8 Гц, 4'-Н), 3,94 м (2H; 5'-а-Н и 5'-б-Н), 1,57 с (3H; Me); сигнал 2'-Н закрыт сигналом HOD. ³¹P-ЯМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): +18,87 с.

1-(3'-С-Метил-β-D-рибофуранозил)урацил-3'-фосфат (VI). К раствору 5,2 мг аммониевой соли циклофосфата (VII) в 0,5 мл D₂O в ампуле для ЯМР-спектрометра при рН 7,15 прибавляли 1,2 мг панкреатической рибонуклеазы (КФ 3.1.27.5, первоначально КФ 3.1.4.22). За ходом реакции следили, периодически регистрируя ПМР- и ³¹P-ЯМР-спектры. Время полугидролиза составляло 24 ч при 20° С (см. рисунок). Через 5 сут при 20° С смесь наносили на колонку с сефадексом G-25 (1,5×60 см) и элюировали водой. УФ-поглощающие фракции, содержащие продукт, наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻-форма, объем 30 мл). Дальнейшее выделение проводили аналогично выделению нуклеотидов (V) и (VI). Выход аммониевой соли соединения (VI) 3,8 мг (64%). R_f 0,16 (Б). УФ-спектр идентичен спектру уридин-3'-фосфата. ПМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 7,98 д (1H, J_{6,5} 8,0 Гц, 6-Н), 6,08 д (1H, J_{1',2'} 8,0 Гц, 1'-Н), 5,96 д (1H, J_{5,6} 8,0 Гц, 5-Н), 4,21 дд (1H, J_{2',3'} 8,0 Гц, J_{2',3'} 3,3 Гц, 2'-Н), 3,85 м (3H, 4'-Н, 5'-а-Н и 5'-б-Н), 1,65 с (3H, Me). ³¹P-ЯМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): -2,48 с.

Гидролиз 1-(3'-С-метил-β-D-рибофуранозил)урацил-3'-фосфата (VI) эндонуклеазой S₁. К раствору 0,3 мг диаммониевой соли нуклеотида (VI) в 0,1 мл 1 M натрий-ацетатного буфера (рН 5,2) прибавляли 20 мкл 3·10⁻⁶ M раствора эндонуклеазы S₁ (КФ 3.1.30.1, первоначально КФ 3.1.4.21) в 0,03 M ацетатном буфере (рН 4,7), содержащем 10⁻⁴ M ZnCl₂. Реакционную смесь оставляли на 2 сут при 20° С. Хроматография в тонком слое демонстрировала полное превращение цуклеозид-3'-фосфата (VI) в 3'-С-метилуридин (III), идентичный заведомому образцу.

1-(2',3'-О-Этоксиметил)-3'-С-метил-β-D-рибофуранозил)урацил (VIII) К раствору 170 мг (0,66 ммоль) 3'-С-метилуридина (III) в 1,2 мл DMF и 0,5 мл триэтилортоформиата прибавляли 0,1 мл 6 M HCl в DMF и раствор оставляли на 16 ч при 20° С. К реакционной смеси добавляли 0,1 мл три-

этиламина, 10 мл воды и экстрагировали эфиром (10 мл). Органический слой промывали водой (10 мл), объединенные водные слои экстрагировали этилацетатом (5×20 мл), этилацетатные слои сушили Na_2SO_4 , фильтровали, упаривали в вакууме досуха и получали 170 мг масла. R_f 0,18 (А). По данным хроматографии и ПМР-спектров, в продукте имеется 10% примесь бисортоэфирного производного с R_f 0,41 (А).

Чистое соединение (VIII) может быть выделено хроматографией на силикагеле в системе $\text{CHCl}_3 - \text{EtOH}$, 97,5:2,5. Выход продукта (VIII) 140 мг (69%). ПМР-спектр (CDCl_3 , δ , м.д.): 9,66 ус (1H, NH, обменивается при добавлении D_2O), 7,63 д (0,5H, $J_{6,5}$ 8,0 Гц, 6-H), 7,55 д (0,5H, $J_{6,5}$ 8,0 Гц, 6-H), 6,03 с (0,5H, ортоэфирный протон), 6,01 с (0,5H; ортоэфирный протон), 5,92 д (0,5H, $J_{1',2'}$ 4,0 Гц, 1'-H), 5,72 д (0,5H, $J_{1',2'}$ 3,5 Гц, 1'-H), 5,70 д (1H, $J_{5,6}$ 8,0 Гц, 5-H), 4,62 д (0,5H, $J_{2',1'}$ 3,5 Гц, 2'-H), 4,60 д (0,5H, $J_{2',1'}$ 4,0 Гц, 2'-H), 4,20–3,86 м (3H, 4'-H, 5'-а-H и 5'-б-H), 3,68 к (1H, J 7,0 Гц, OCH_2CH_3), 3,62 к (1H, J 7,0 Гц, OCH_2CH_3), 1,62 с (1,5H, Me), 1,52 с (1,5H, Me), 1,24 т (1,5H, J 7,0 Гц, OCH_2CH_3), 1,20 т (1,5H, J 7,0 Гц, OCH_2CH_3). Смесь диастереомеров в соотношении 1:1.

1-(3'-С-Метил- β -D-рибофуранозил)урацил-5'-фосфат (IX). Раствор 140 мг неочищенного соединения (VIII) в смеси 1 мл 1 М раствора пиридиниевой соли 2-цианэтилфосфата в абс. пиридине и 3 мл абс. пиридина упаривали в вакууме досуха, остаток упаривали в абс. пиридином (3×5 мл), растворяли в 6 мл абс. пиридина, добавляли 0,6 г (2 ммоль) триэтилоксибензолсульфохлорида и смесь оставляли на 3 ч при 20°С. К смеси добавляли 5 мл воды, перемешивали 1 ч при 20°С, экстрагировали эфиром (2×10 мл), водный слой разбавляли водой до объема ~100 мл, наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- -форма, объем 200 мл), колонку промывали водой (500 мл) и хроматографировали NH_4HCO_3 в градиенте концентрации (0,0→0,1 М, общий объем 6 л). 2-Цианэтиловый эфир 5'-нуклеотида элюировался 0,03–0,04 М NH_4HCO_3 . Фракции, содержащие продукт, упаривали в вакууме досуха, затем с водой (5×10 мл). Остаток растворяли в 13 мл 1 н. NaOH и через 5 мин при 20°С наносили на колонку с дауэком 50 (H^+ -форма, объем 45 мл) и элюировали водой. УФ-поглощающие фракции, содержащие продукт, объединяли, доводили 1 М NH_4OH до pH 8, наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- -форма, объем 200 мл) и хроматографировали в градиенте NH_4HCO_3 (0,0→0,2 М, общий объем 6 л). УФ-поглощающие фракции, элюировавшиеся 0,12–0,13 М NH_4HCO_3 , объединяли, упаривали в вакууме досуха, затем с водой (5×10 мл) и лиофилизовали. Выход диаммониевой соли 5'-нуклеотида (IX) 64 мг (32% в расчете на нуклеозид (III)). R_f 0,15 (В), R_f 0,51 (В). Для уридин-5'-фосфата R_f 0,50 (В). УФ-спектр идентичен спектру уридин-5'-фосфата. ПМР-спектр (D_2O , δ , м.д.): 8,22 д (1H, $J_{6,5}$ 8,0 Гц, 6-H), 6,13 д (1H, $J_{1',2'}$ 8,0 Гц, 1'-H), 6,06 д (1H, $J_{5,6}$ 8,0 Гц, 5-H), 4,26 д (1H, $J_{2',1'}$ 8,0 Гц, 2'-H), 4,24–3,98 м (3H, 4'-H, 5'-а-H и 5'-б-H), 1,46 с (3H, Me). ^{31}P -ЯМР-спектр (D_2O , δ , м.д.): +1,17 с.

1-(3'-С-Метил- β -D-рибофуранозил)урацил-5'-трифосфат (X). К раствору 50 мг (0,134 ммоль) диаммониевой соли нуклеотида (IX) в 2 мл воды добавляли 0,04 мл три-*n*-бутиламина, смесь перемешивали 2 ч при 20°С, упаривали в вакууме досуха, упаривали с абс. DMF (3×3 мл), остаток растворяли в 3 мл абс. DMF, к раствору прибавляли 65,7 мг (0,4 ммоль) $\text{N,N}'$ -карбонилдимидзола и смесь перемешивали 16 ч при 20°С. К смеси прибавляли 0,7 мл 1 М раствора MeOH в DMF, через 20 мин при 20°С — раствор 0,67 ммоль три-*n*-бутиламмониевой соли пиродифосфорной кислоты в 3,5 мл DMF и смесь перемешивали 16 ч при 20°С. Осадок отфильтровывали, промывали 5 мл DMF, к объединенным фильтратам прибавляли 5 мл этанола, смесь упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 100 мл воды, наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- форма, объем 200 мл) и хроматографировали в градиенте концентрации NH_4HCO_3 (0,0→0,4 М, общий объем 6 л). УФ-поглощающие фракции, элюировавшиеся 0,20–0,22 М NH_4HCO_3 , объединяли, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5×10 мл) и лиофилизовали. Выход аммониевой соли трифосфата (X) 30 мг (40%). R_f 0,12 (В). Для уридин-5'-трифосфата

δ , 0,11 (B), УФ-спектр идентичен спектру уридин-5'-трифосфата. ПМР-спектр (D_2O , δ , м.д.): 8,10 д (1H, $J_{6,5}$ 8,0 Гц, 6-H), 6,12 д (1H, $J_{1',2'}$ 8,0 Гц, 1'-H), 6,06 д (1H, $J_{5,6}$ 8,0 Гц, 5-H), 4,25 м (3H, 4'-H, 5'-a-H и 5'-b-H), 4,24 д (1H, $J_{2',1'}$ 8,0 Гц 2-H), 1,48 с (3H, Me).

Авторы благодарят Л. Н. Бейгельмана (ВНИИВИ) за помощь, оказанную в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smrt J., Mikhailov S. N., Hynie S., Florentiev V. L. Coll. Czech. Chem. Commun., 1975, v. 40, № 11, p. 3399-3403.
2. Крицын А. М., Михайлов С. Н., Мишарин А. Ю., Падюкова Н. Ш., Флорентьев В. Л. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 10, с. 1338-1350.
3. Михайлов С. Н. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 5, с. 639-644.
4. Карпейский М. Я., Михайлов С. Н. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 895-905.
5. Rosenthal A., Mikhailov S. N. Carbohydr. Res., 1980, v. 79, № 2, p. 235-242.
6. Бейгельман Л. Н., Карпейский М. Я., Михайлов С. Н. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1701-1710.
7. Карпейский М. Я., Михайлов С. Н., Падюкова Н. Ш. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 7, с. 933-939.
8. Rosenthal A., Mikhailov S. N. J. Carbohyd. Nucleosides, Nucleotides, 1979, v. 6, № 3, p. 237-245.
9. Beigelman L. N., Karpeisky M. Ya., Mikhailov S. N., Rosenthal A. Nucl. Acids Res., Symp. Ser. № 9, 1981, p. 115-118.
10. Nutt R. F., Dickinson M. J., Holly F. W., Walton E. J. Org. Chem., 1968, v. 33, № 5, p. 1789-1795.
11. Jenkins S. R., Arison B., Walton E. J. Org. Chem., 1968, v. 33, № 6, p. 2490-2494.
12. Ranganathan R. S., Jones G. H., Mojfat J. G. J. Org. Chem., 1974, v. 39, № 3, p. 290-298.
13. Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 10, с. 1293-1317.
14. Tener G. M. J. Amer. Chem. Soc., 1961, v. 83, № 1, p. 159-168.
15. Shugar D. In: Methods in Enzymology/Eds Grossman L., Moldave K. Acad. Press, 1967, v. XII, part A, p. 131-137.
16. Davies D. B. In: Progress in NMR Spectroscopy. Pergamon Press, 1978, v. 12, p. 135-225.
17. Cozzone P. J., Jardetzky O. Biochemistry, 1976, v. 15, № 22, p. 4853-4859.
18. Сенченко В. Н., Колбановская Е. Ю., Яковлев Г. И., Карпейский М. Я. Докл. АН СССР, 1980, т. 251, № 3, с. 746-750.
19. Walton E., Jenkins S. R., Nutt R. F., Holly F. W. J. Med. Chem., 1969, v. 12, № 3, p. 306-309.
20. Shigeura H. T., Sampson S. D. Nature, 1967, v. 215, № 5099, p. 419-420.
21. Padyukova N. Sh., Smrt J. Coll. Czech. Chem. Commun., 1980, v. 45, № 9, p. 2550-2557.
22. Zemlicka J. Chem. Ind., 1964, № 3, p. 581.
23. Griffin B. E., Jarman M., Reese C. B., Sulston J. E. Tetrahedron 1967, v. 23, № 5, p. 2301-2313.
24. Hoard D. E., Ott D. G. J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 8, p. 1785-1788.

Поступила в редакцию
15.IX.1982

SYNTHESIS OF 3'-C-METHYLURIDINE PHOSPHATE ESTERS

KARPEISKY M. Ya., MIKHAILOV S. N., PADYUKOVA N. Sh., YAKOVLEV G. I.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Synthesis of some 3'-C-methyluridine phosphate esters was described. Hydrolysis of 1-(2',3'-di-O-acetyl-5'-O-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)uracil with triethylamine - MeOH mixture yielded 1-(5'-O-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)uracil. Its phosphorylation with 2-cyanoethyl phosphate in the presence of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide followed by the removal of protecting groups afforded 3'-C-methyluridine 2' (3')-phosphate, which was converted to 3'-C-methyluridine 2',3'-cyclic phosphate. Analogous phosphorylation of 2',3'-O-ethoxymethylidene-3'-C-methyluridine gave 3'-C-methyluridine 5'-phosphate, which was used for the synthesis of 3'-C-methyluridine 5'-triphosphate.