



УДК 547.963.32.07

## КОНФОРМАЦИОННЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕОТИДОВ

V. СИНТЕЗ 5'-С-МЕТИЛНУКЛЕОЗИДОВ НА ОСНОВЕ 6-ДЕЗОКСИ-*D*-АЛЛОЗЫ\**Карнейский М. Я., Михайлов С. Н.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Синтезированы аналоги нуклеозидов на основе 6-дезоксид-аллозы. Кислотный гидролиз метил-2,3-О-изопропилиден-5-О-*n*-нитробензоил-6-дезоксид-β-*D*-аллофуранозиды с последующим бензоилированием и ацетилированием приводил к 1-О-ацетил-2,3-ди-О-бензоил-5-О-*n*-нитробензоил-6-дезоксид-*D*-аллофуранозе, конденсация которой с триметилсилильными производными урацила, цитозина и №-бензоиладенина в присутствии четыреххлористого олова в дихлорэтане давала полностью ацилированные 5'-С-метилнуклеозиды, полученные также гликозилированием 1,2,3-три-О-ацетил-5-О-*n*-нитробензоил-6-дезоксид-*D*-аллофуранозы. Удаление ацильных защитных групп приводило к 5'-С-метильным аналогам уридина, цитидина и аденозина.

Ранее в нашей лаборатории были синтезированы конформационно-подвижные аналоги нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов, в которых при сохранении всех функциональных групп природных соединений фуранозный цикл заменен полиоксиметиленовой цепью [1-4]. Синтезированные соединения нашли широкое применение для изучения механизма действия различных ферментов [2, 5-10]. В связи с этим представлялось интересным получить аналоги нуклеозидов с конформацией, отличной от конформации природных соединений, путем введения инертных алкильных заместителей в углеводную часть молекулы, что приведет к изменению конформации рибофуранозного цикла, экзоциклической 5'-оксиметильной группы и положения гетероциклического основания относительно углеводного остатка. Подобные соединения были описаны в работах Валтона с сотр. [11-16], Бэйкера с сотр. [17, 18], Моффата с сотр. [19], Хамптона с сотр. [20, 21] и Лернера [22]. Особое внимание было уделено получению 5'-С-метильных производных аденозина [12, 17-22], в то время как аналогичные производные пириимидиновых нуклеозидов до настоящего времени не были синтезированы.

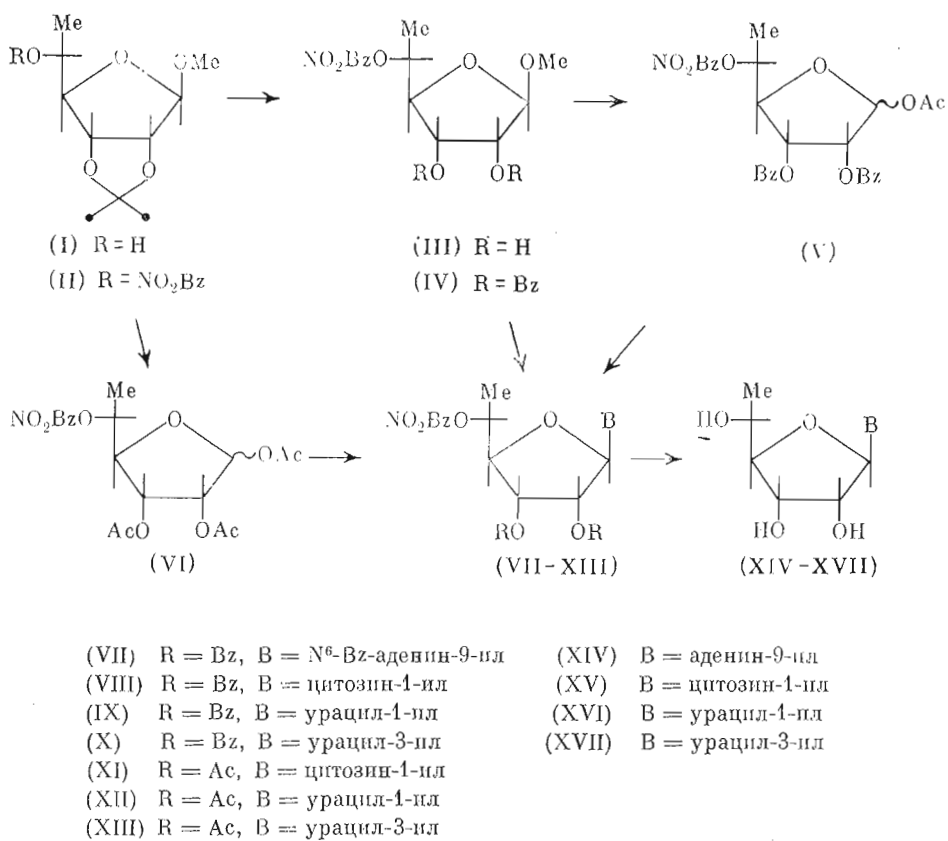
Целью настоящей работы являлась разработка удобного пути синтеза 5'-С-метильных производных уридина, цитидина и аденозина. Имеются две принципиально различные схемы синтеза этих соединений. Первая заключается во взаимодействии реактивов Гриньяра с 5'-альдегидами нуклеозидов и разделении получаемых диастереомеров *D*-алло- и *L*-талоуряда [19, 20]. По второй схеме из *L*-рамнозы синтезируют соответствующим образом защищенный 6-дезоксид-*D*-алло- или 6-дезоксид-*L*-талофуранозид [17, 18, 22, 23] и им гликозилируют нуклеиновые основания. На наш взгляд, второй подход более универсален, так как позволяет получить

\* Предыдущее сообщение см. [1].

из одного исходного соединения аналоги нуклеозидов с различными гетероциклическими основаниями, в то время как разделение диастереомеров, полученных по первой схеме, связано с определенными сложностями [19, 20].

Синтез аналогов нуклеозидов был осуществлен по приведенной схеме. Исходный метил-2,3-О-изопропилиден-6-дезоксид-β-D-аллофуранозид (I) получали по модифицированному методу [17, 23, 24].

Известно, что *n*-нитробензоильные производные углеводов по сравнению с другими ацильными производными лучше кристаллизуются, поэтому в качестве защитной группы была выбрана 5-О-*n*-нитробензоильная, а не бензоильная, как в работе [17]. Обработка соединения (I) *n*-нитробензоилхлоридом в пиридине приводила к полностью защищенному фуранозиду (II) с количественным выходом. Кипячение соединения (II) в метаноле, содержащем конц. HCl [17], давало смесь аномеров метил-5-О-*n*-нитробензоил-6-дезоксид-β-D-аллофуранозидов, из которой выделяли кристаллический β-аномер (III) с выходом 49%. Бензоилированием соединения (III) получали кристаллический метил-β-фуранозид (IV). Ацетилизация последнего давала с высоким выходом смесь аномеров 1-ацетил-β-D-аллофуранозидов (V). Кристаллизацией из метанола удается получить β-аномер (V).



Структура соединений (I–V) подтверждена спектрами ПМР. Для β-аномеров рибофуранозидов, имеющих *транс*-расположение 1-Н–2-Н-протонов, характерна величина константы взаимодействия  $J_{1,2} < 0,5$  Гц [25].

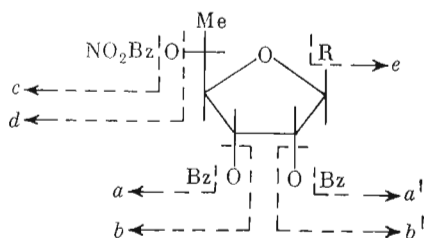
Величина удельного вращения для β-ацетилфуранозидов (V) близка к величине, приведенной в работе [17] для 1-О-ацетил-2,3,5-три-О-бензоил-β-дезоксид-β-D-аллофуранозидов. Однако авторы не указывали, какой аномер

они получили. Из наших данных следует, что в этой работе получен  $\beta$ -аномер.

Гидролиз соединения (II) 85% муравьиной кислотой (80°, 20 ч) с последующим ацелированием приводил с высоким выходом к фуранозиду (VI).

Триметилсилильные производные N<sup>6</sup>-бензонладенила, цитозина и урацила гликозилировали ацетатами фуранозидов (V) и (VI) в дихлорэтано в присутствии четыреххлористого олова [26–28]. Хроматографией на силикагеле получали защищенные нуклеозиды (VII–XIII) с хорошими выходами. При гликозилировании бис(триметилсилил)урацила наряду с N-1-изомером образуется небольшое количество N-3-изомера, что уже отмечалось ранее [29]. Соединение (IX) было также получено исходя из метилфуранозида (IV) в более жестких условиях с выходом 42%. В качестве углеводных компонентов в реакции использовались как чистые кристаллические  $\beta$ -аномеры (IV–VI), так и смеси их  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров. Синтез нуклеозидов из различных 1-O-замещенных углеводов демонстрирует универсальность использованного метода гликозилирования.

Для доказательства структуры синтезированных соединений были изучены их масс-спектры. На схеме представлены основные распады молекулярных ионов исследованных соединений:



Наиболее заметные пики (см. таблицу) соответствуют отрыву Bz, BzO или BzOH, NO<sub>2</sub>Bz, NO<sub>2</sub>BzO или NO<sub>2</sub>BzOH и R с преимущественной стабилизацией положительного заряда на этих группах. Как видно из таблицы, в масс-спектрах также наблюдаются пики, соответствующие отрыву двух групп от молекулярного иона. Аналогичные процессы описаны в работе [30]. Пики молекулярных ионов, а также пики, соответствующие распаду углеводного остова, имеют низкую интенсивность. Масс-спектры, приведенные в таблице, подтверждают структуру синтезированных соединений.

Удаление ацильных групп из защищенных нуклеозидов осуществляли метанольным раствором аммиака, что приводило к искомым аналогам нуклеозидов (XIV–XVI). Аналогично получали 3-(6-дезоксид- $\beta$ -D-аллофуранозил)урацил (XVII). Структура синтезированных соединений подтверждена УФ-, ПМР- и КД-спектрами. УФ-спектры нуклеозидов (XIV) – (XVII) совпадают со спектрами соответствующих природных  $\beta$ -D-рибофуранозидов по форме и положению максимумов [31].

В спектрах ПМР нуклеозидов (XV) и (XVI) (рис. 1) удивительным является сложная мультиплетность 1'-H-протона, который, по данным двойного резонанса, взаимодействует с 5-H, 2'-H, 3'-H и 4'-H-протонами, причем спектр ПМР уридинового производного (XVI) принципиально не отличается от спектра аналога цитидина (XV). В случае же аденинового (XIV) и N-3-урацильного (XVII) производных отнесение спектров ПМР значительно проще. Сложность интерпретации приведенных на рис. 1 спектров заключается также в том, что разница в химических сдвигах 2'-H и 3'-H-протонов меньше 1 Гц. В настоящее время проводится полный анализ этих спектров.

Молекулярные ионы в масс-спектрах производных 6-дезоксид-*D*-аллофуранозы  
Приведены массовые числа ионов (в скобках относительная интенсивность,  
% от  $\Sigma_{105}$ )

Типы распадов	( $\beta$ -IV)	( $\beta$ -V)	(VII)	(VIII)	(IX)	(X)
<i>a</i>	105 (8,5)	105 (9,8)	105 (17)	105 (30)	105 (27)	105 (15,1)
<i>b</i> +H	122 (4,5)	122 (7,7)	122 (12,2)	122 (26)	122 (2)	122 (18,6)
<i>c</i>	150 (6,6)	150 (6,5)	150 (11)	150 (4,7)	150 (4,1)	150 (14,1)
<i>d</i> +H	167 (0,4)	167 (8,5)	167 (6,3)	167 (21,5)	167 (0,2)	167 (1,6)
<i>e</i>			238 (1,2)	110 (2,2)	111 (0,3)	111 (1,3)
<i>e</i> +H			239 (4,6)	111 (2,4)	112 (0,3)	112 (1,3)
<i>M</i> - <i>d</i>					449 (0,1)	449 (0,3)
<i>M</i> -( <i>d</i> +H)	368 (0,7)					
<i>M</i> - <i>c</i>		413 (1,7)			465 (0,1)	465 (0,3)
<i>M</i> -( <i>b</i> +H)		441 (0,1)			493 (1,4)	493 (3,3)
<i>M</i> -( <i>b</i> +2H)				491 (0,1)		
<i>M</i> - <i>a</i>		458 (0,01)	637 (0,05)			
<i>M</i> -Me	520 (0,03)					
<i>M</i> -( <i>e</i> +H)				503 (0,2)		
<i>M</i> -( <i>e</i> +2H)		502 (0,8)	502 (3,3)		502 (3,7)	502 (0,05)
<i>M</i> <sup>+</sup>		563 (0,01)				
<i>M</i> -( <i>d</i> + <i>e</i> +H)					337 (0,23)	
<i>M</i> -( <i>b</i> + <i>d</i> +H)				326 (0,2)		327 (1,2)
<i>M</i> -( <i>b</i> + <i>d</i> +2H)	246 (6,1)				326 (0,7)	
<i>M</i> -( <i>b</i> + <i>d</i> -H)	249 (1,5)	277 (0,5)				
<i>M</i> -( <i>b</i> + <i>c</i> +H)		291 (0,7)			343 (0,1)	
<i>M</i> -( <i>b</i> + <i>c</i> +2H)						342 (0,1)
<i>M</i> -( <i>c</i> + <i>e</i> +H)	353 (1,7)	353 (0,9)	353 (0,6)			
<i>M</i> -( <i>c</i> + <i>e</i> +2H)						352 (0,1)
<i>M</i> -( <i>a</i> + <i>a'</i> )	325 (0,2)					
<i>M</i> -( <i>a</i> + <i>c</i> )		308 (3,4)	487 (0,6)			
<i>M</i> -( <i>b</i> + <i>b'</i> +H)	292 (1,4)					
<i>M</i> -( <i>b</i> + <i>b'</i> +2H)	291 (1,4)				371 (0,1)	371 (0,2)
<i>M</i> -( <i>b</i> + <i>b'</i> -H)			501 (3,3)			
<i>M</i> -( <i>b</i> + <i>e</i> +H)			382 (0,4)		382 (0,1)	
<i>M</i> -( <i>b</i> + <i>e</i> +2H)		381 (1,6)			381 (0,1)	

Для доказательства структуры полученных соединений аналог уридина (XVI) был превращен в соответствующее 2',3'-О-изопропилиденное производное (XVIII). Величины констант  $J_{1,2}$ , 2,5 и  $J_{3,4}$ , 3,0 Гц характерны для *транс*-протонов [25]. Разница химических сдвигов метильных групп 0,19 м.д. согласуется с эмпирическим правилом для изопронилиденных производных  $\alpha, \beta$ -*D*-рибофуранозидов: для  $\beta$ -аномеров  $\Delta\delta > 0,15$  м.д., а для  $\alpha$ -аномеров  $\Delta\delta < 0,15$  м.д. [32, 33].

Спектры КД соединений (XIV–XVII) (рис. 2) как по форме, так и по амплитуде близки спектрам соответствующих  $\beta$ -*D*-рибофуранозидов [34, 35]. Амплитуда положительного длинноволнового катон-эффекта в соединениях (XV) и (XVI) меньше, чем в природных соединениях. Полученные данные также подтверждают структуру синтезированных соединений [4].

#### Экспериментальная часть

Спектры ПМР регистрировали на спектрометре Varian XL-100 (США) с рабочей частотой 100 МГц; химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно внутреннего стандарта *трет*-бутанола (для растворов в D<sub>2</sub>O) и гексаметилдисилоксана (для CDCl<sub>3</sub>). Величины констант спин-спинового взаимодействия ( $J$ ) измерены в Гц. Спектры КД записывали на дихрографе Jobin-Yvon Dichrograph III (Франция), используя кюветы с оптическим путем в 1 см при чувствительности прибора  $5 \cdot 10^{-6}$ . УФ-спектры снимали на приборе Specord UV VIS (ГДР). Масс-спектры получены на спектрометре MC 1302 (СССР) при энергии ионизирующих электронов 70 эВ. Образцы испарялись непосредственно в область иони-

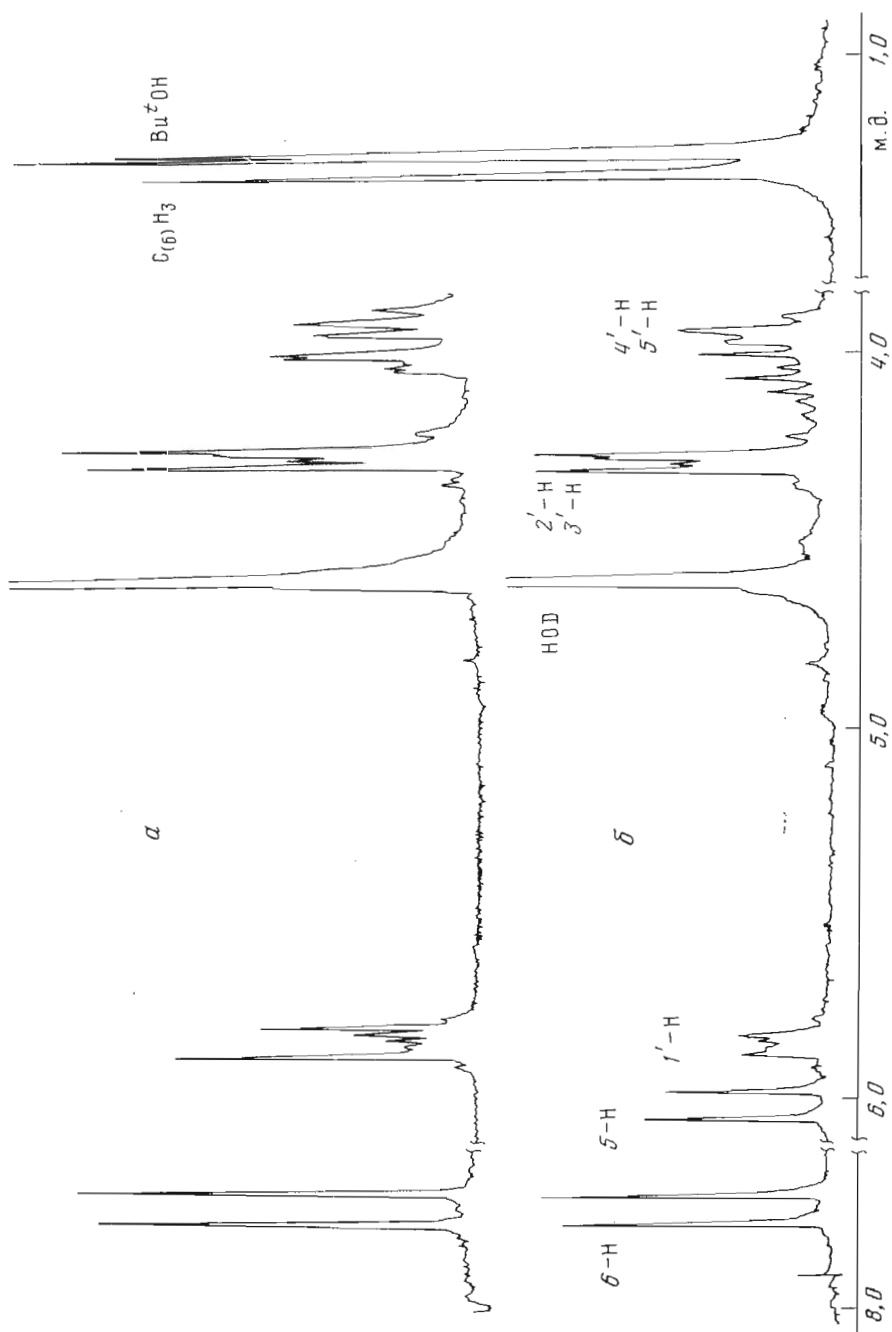


Рис. 1. Спектры ПМР в D<sub>2</sub>O при 30°:  $\alpha$  – слабополярная часть спектра 5'-С-метилцитидина (XVI),  $\delta$  – спектр 5'-С-метилцитидина (XV)

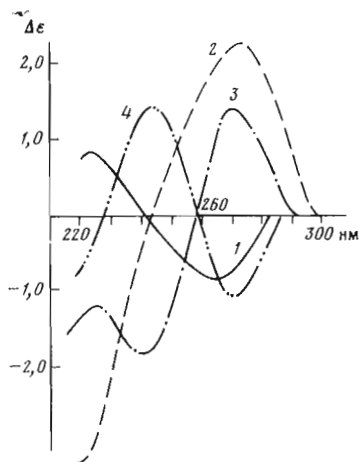


Рис. 2. Спектры КД в воде при 20°: 1 — 5'-С-метиладенозин (XIV); 2 — 5'-С-метилцитидин (XV); 3 — 5'-С-метилуридин (XVI); 4 — соединенис (XVII)

200 мл сухого пиридина и при перемешивании и охлаждении до 0° порциями (по 10 г) добавляли 53,5 г (0,28 моль) *n*-толуолсульфохлорида и оставляли при 20° на 16 ч. Смесь выливали в 250 мл воды со льдом, перемешивали 30 мин и добавляли 250 мл хлороформа. Органический слой промывали последовательно холодной водой (2×100 мл), холодной 10%-ной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2×100 мл), водой (100 мл), насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2×100 мл), водой (2×100 мл), сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали досуха и получали 55 г (0,154 моль) неочищенной 5-О-тозил-2,3-О-изопротилден-6-дезоксид-*L*-маннофуранозы. К раствору полученного тозилата в 100 мл абс. метанола добавляли раствор метилата натрия в 400 мл абс. метанола (из 7,1 г натрия) и оставляли на 16 ч при 20°. Нейтрализовали твердым CO<sub>2</sub>, упаривали досуха, к остатку добавляли 300 мл хлороформа, фильтровали и фильтрат упаривали досуха. К остатку добавляли 50 мл хлороформа и оставляли на 16 ч при 20°. Еще раз фильтровали, упаривали досуха и остаток перегоняли в вакууме дважды: т. кип. 79–82°/1 мм рт. ст. Выход 17 г (28%). Лит. данные [24]: т. кип. 74–76°/0,7 мм рт. ст. Спектр ПМР в CDCl<sub>3</sub>, δ: 4,85 с (1H; 1-H); 4,76 д (1H, *J* 6,5; 3-H); 4,47 д (1H, *J* 6,5; 2-H); 4,04 д (1H, *J* 2,5; 4-H); 3,74 м (1H, *J* 2,5 и 6,5; 5-H); 3,41 с (3H, OMe); 1,40 с (3H; Me); 1,26 с (3H; Me); 1,14 д (3H, *J* 6,5; C<sub>(6)</sub>H<sub>5</sub>).

*Метил-2, 3-О-изопротилден-5-О-*n*-нитробензоил- 6-дезоксид- β-D-аллофуранозид (II)*. К раствору 6,6 г (30 ммоль) соединения (I) в 60 мл абс. пиридина при 0° и перемешивании добавляли 6,1 г (35 ммоль) *n*-нитробензоилхлорида и оставляли при 0° на 16 ч. Добавляли 50 г льда, перемешивали 15 мин, затем добавляли 150 мл хлороформа, органический слой отделяли, промывали последовательно водой (2×50 мл), насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2×30 мл), водой (50 мл), сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, фильтрат упаривали досуха и остаток упаривали с толуолом (2××20 мл). Получали 11,0 г масла, выход количественный. *R<sub>f</sub>* 0,95 (A). Спектр ПМР в CDCl<sub>3</sub>, δ: 8,21 д (4H, *J* 1,5; NO<sub>2</sub>Bz); 5,17 м (1H, *J* 8,0 и 6,5; 5-H); 4,95 с (1H; 1-H); 4,78 дд (1H, *J* 6,0 и 1,0; 3-H); 4,47 д (1H, *J* 6,0; 2-H); 4,22 дд (1H, *J* 1,0 и 8,0; 4-H); 3,26 с (3H; OMe); 1,45 с (3H; Me); 1,40 д (3H, *J* 6,5; C<sub>(6)</sub>H<sub>5</sub>); 1,26 с (3H; Me).

*Метил-5-О-*n*-нитробензоил-6-дезоксид-β-D-аллофуранозид (III)*. Смесь 10,4 г (28,4 ммоль) соединения (II), 100 мл метанола и 2 мл конц. HCl кипятили 2 ч. Хроматография в тонком слое демонстрирует полный гид-

зации при температурах 100–200°. Удельное вращение измеряли на автоматическом поляриметре Perkin-Elmer 141 (ФРГ). Хроматографию проводили на пластинках Silufol UV<sub>254</sub> (ЧССР) в системах: CHCl<sub>3</sub> (A); CHCl<sub>3</sub>–EtOH, 97,5:2,5 (Б); CHCl<sub>3</sub>–EtOH, 95:5 (B); CHCl<sub>3</sub>–EtOH, 7:3 (Г).

*Метил- 2,3 - О-изопротилден - 6 - дезокси-β-D-аллофуранозид (I)*. Смесь 50 г (0,275 моль) моногидрата *L*-рамнозы, 60 г безводного сульфата меди и 1,8 мл 96%-ной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с 900 мл ацетона перемешивали 24 ч при 20°, фильтровали, к фильтрату добавляли 7 мл конц. NH<sub>4</sub>OH и отделяли выпавший осадок фильтрованием. Фильтрат упаривали в вакууме досуха, к остатку добавляли 300 мл хлороформа и оставляли на ночь при 20°. Снова фильтровали, фильтрат упаривали досуха и получали 56 г (0,275 моль) неочищенной 2,3 - О-изопротилден-6-дезоксид-*L*-маннофуранозы. Полученное масло растворяли в

ролиз исходного (II). Реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 200 мл хлороформа, раствор промывали последовательно холодным насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 30$  мл), водой (50 мл), сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и упаривали досуха. Полученное масло растворяли в 20 мл эфира и оставляли на 16 ч при  $0^\circ$ . Кристаллический  $\beta$ -аномер (III) отфильтровывали. Выход 4,5 г (49%). Т. пл.  $107-108^\circ$ .  $[\alpha]_D^{20} -62,4^\circ$  (*c* 1,9; MeOH). Найдено, %: С 51,26; Н 5,30.  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_8$ . Вычислено, %: С 51,38; Н 5,24. Спектр ПМР в  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ : 8,24 с (4H;  $\text{NO}_2\text{Bz}$ ); 5,35 м (1H; 5-H); 4,83 с (1H; 1-H); 4,47 м (1H; 4-H); 4,05 м (2H; 2-H и 3-II); 3,20 с (3H; OMe); 1,46 д (3H, *J* 6,5;  $\text{C}_{(6)}\text{H}_3$ ).

Фильтрат упаривали досуха и получали 3,7 г; 40% маслообразной смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров (III).

*Метил-2, 3-ди-О-бензоил-5-О-п-нитробензоил-6-дезоксид- $\beta$ -D-аллофуранозид (IV)*. К раствору 3,6 г (11 ммоль)  $\beta$ -аномера соединения (III) в 50 мл абс. пиридина при перемешивании и охлаждении до  $-20^\circ$  добавляли 3,5 мл (30 ммоль) бензоилхлорида и смесь оставляли на 16 ч при  $0^\circ$ . К смеси добавляли 50 мл холодного насыщенного раствора  $\text{NaHCO}_3$  и экстрагировали эфиром ( $2 \times 150$  мл). Каждую эфирную вытяжку промывали последовательно насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (30 мл) и водой ( $2 \times 30$  мл). Объединенные экстракты сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, фильтрат упаривали досуха, упаривали с толуолом ( $3 \times 10$  мл) и сушили в вакууме (1 мм рт.ст.) 1 ч при  $35^\circ$ . Остаток перекристаллизовывали из метанола. Выход 4,0 г (68%). Т. пл.  $97-98^\circ$ .  $[\alpha]_D^{20} +68,3^\circ$  (*c* 1,1;  $\text{CHCl}_3$ ).  $R_f$  0,98 (A). Найдено, %: С 62,94; Н 4,78.  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_{10}$ . Вычислено, %: С 62,80; Н 4,71. Спектр ПМР в  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ : 8,12 с (4H;  $\text{NO}_2\text{Bz}$ ); 7,95–7,15 м (10H; 2Bz); 5,92 м (1H; H-3); 5,60 д (1H, *J* 5,0; H-2); 5,43 м (1H; 5-H); 5,10 с (1H; 1-H); 4,54 м (1H, 4-II); 3,31 с (3H, OMe); 1,49 д (3H, *J* 6,5;  $\text{C}_{(6)}\text{H}_3$ ).

Аналогичное бензоилирование 3,7 г смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров (III) приводило к 5,7 г (94%) частично кристаллизующегося масла соединения (IV) с соотношением  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров, по данным ПМР, 1:1.

*1-О-Ацетил-2,3-ди-О-бензоил-5-О-п-нитробензоил-6-дезоксид-D-аллофураноза (V)*. К раствору 3,2 г (6 ммоль) соединения (IV) ( $\beta$ -аномер) в 20 мл ледяной  $\text{AcOH}$  и 2,2 мл уксусного ангидрида при перемешивании и охлаждении до  $10^\circ$  добавляли 1,2 мл конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и оставляли на 40 ч при  $20^\circ$ . Смесь разбавляли 30 мл хлороформа и выливали при перемешивании в 200 мл холодной воды. Органический слой отделяли, водный слой экстрагировали хлороформом ( $2 \times 100$  мл), объединенные хлороформные экстракты промывали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 50$  мл), водой ( $2 \times 50$  мл), сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, фильтрат упаривали досуха и сушили в вакууме (1 мм рт.ст.) 1 ч при  $35^\circ$ . Выход частично кристаллизующегося масла 3,2 г (95%).  $R_f$  0,96 (A). По данным ПМР, соотношение  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров 1:2. Спектр ПМР в  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ :  $\alpha$ -аномер — 8,30 с (4H;  $\text{NO}_2\text{Bz}$ ); 6,60 д (1H; *J* 4,5; 1-H); 2,16 с (3H; Ac); 1,53 д (3H, *J* 6,5;  $\text{C}_{(6)}\text{H}_3$ );  $\beta$ -аномер — 8,14 с (4H;  $\text{NO}_2\text{Bz}$ ); 6,40 с (1H, 1-H); 1,95 с (3H; Ac); 1,49 д (3H; *J* 6,5;  $\text{C}_{(6)}\text{H}_3$ ).

Ацетоллиз смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров (IV) приводил к соединению (V). После хроматографии на силикагеле (100 г) в системе А выход 87%.

Чистый  $\beta$ -аномер получали кристаллизацией из метанола. Т. пл.  $125-126^\circ$ .  $[\alpha]_D^{20} +35,0^\circ$  (*c* 1,4;  $\text{CHCl}_3$ ). Для 1-О-ацетил-2,3,5-три-О-бензоил-6-дезоксид-D-аллофуранозы  $[\alpha]_D^{24,2} +39,6^\circ$  (1,946% раствор в  $\text{CHCl}_3$ ) [17]. Найдено, %: С 61,65; Н 4,56.  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_{11}$ . Вычислено, %: С 61,81; Н 4,47. Спектр ПМР в  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ : 8,14 с (4H,  $\text{NO}_2\text{Bz}$ ); 8,00–7,20 м (10H; 2Bz); 6,40 с (1H; 1-H); 5,89 дд (1H, *J* 5,0 и 6,0; 3-H); 5,71 д (1H, *J* 5,0; 2-H); 5,45 м (1H, *J* 6,5 и 6,5; 5-II); 4,59 дл (1H, *J* 6,0 и 6,5; 4-H); 1,95 с (3H, Ac); 1,49 д (3H; *J* 6,5;  $\text{C}_{(6)}\text{H}_3$ ).

*1,2,3-Три-О-ацетил-5-О-п-нитробензоил-6-дезоксид-D-аллофураноза (VI)*. Смесь 3,3 г соединения (II) и 40 мл 85%-ной  $\text{HCOOH}$  нагревали

20 ч при 80°, упаривали досуха, упаривали с *n*-бутанолом (3×15 мл), с толуолом (2×10 мл), с абс. пиридином (3×10 мл), к остатку добавляли 30 мл абс. пиридина и 20 мл уксусного ангидрида и оставляли на 16 ч при 20°. Добавляли 50 мл холодной воды, перемешивали 30 мин и экстрагировали хлороформом (2×100 мл). Объединенные хлороформные экстракты промывали водой (2×100 мл), насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2×50 мл), водой (100 мл), сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, упаривали досуха и упаривали с толуолом (2×20 мл). Остаток хроматографировали на силикагеле (100 г) в системе А. Фракции, содержащие продукт, упаривали досуха и получали 3,2 г масла, выход 86%. *R<sub>f</sub>* 0,80 (А). По данным ПМР, практически чистый β-аномер. Спектр ПМР в CDCl<sub>3</sub>, δ: 8,24 с (4H; NO<sub>2</sub>Bz); 6,17 д (1H, *J* 0,7; 1-H); 5,80–5,23 м (3H, 2-H, 3-H и 5-H); 4,38 м (1H; 4-H); 2,12 с (3H; Ac); 2,02 с (3H; Ac); 1,88 с (3H; Ac); 1,42 д (3H, *J* 6,5; C<sub>(6)</sub>H<sub>3</sub>).

*N*<sup>6</sup>-Бензоил-9-(2',3'-ди-*O*-бензоил-5'-*O*-*n*-нитробензоил-6'-дезоксид-β-*D*-аллофуранозил)аденин (VII). Суспензию 1,2 г (5 ммоль) сухого *N*<sup>6</sup>-бензоиладенина в 20 мл гексаметилдисилазана и 0,2 мл триметилхлорсилана кипятили с обратным холодильником без доступа влаги воздуха до полного растворения (~30 ч), упаривали досуха и к остатку добавляли 1,8 г (3,2 ммоль) соединения (V) и 20 мл абс. дихлорэтана. К раствору добавляли 0,6 мл (5 ммоль) SnCl<sub>4</sub> в 10 мл абс. дихлорэтана и кипятили с обратным холодильником без доступа влаги воздуха 2 ч. После охлаждения смеси добавляли 100 мл хлороформа и 50 мл насыщенного раствора NaHCO<sub>3</sub> и перемешивали 20 мин при 20°. Смесь фильтровали, органический слой отделяли, последовательно промывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (30 мл), водой (30 мл), сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали досуха. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (100 г) в системе А. Фракции, содержащие продукт, упаривали и к остатку добавляли эфир. Выход 1,2 г (51%). *R<sub>f</sub>* 0,22 (А), 0,90 (Б). Найдено, %: С 62,69; Н 3,81. С<sub>39</sub>Н<sub>30</sub>Н<sub>6</sub>О<sub>10</sub>. Вычислено, %: С 63,07; Н 4,07.

1-(2',3'-Ди-*O*-бензоил-5'-*O*-*n*-нитробензоил-6'-дезоксид-β-*D*-аллофуранозил)цитозин (VIII). Суспензию 0,56 г (5 ммоль) сухого цитозина в 5 мл гексаметилдисилазана и 0,2 мл триметилхлорсилана кипятили с обратным холодильником без доступа влаги воздуха до полного растворения (~3 ч), упаривали досуха и к остатку добавляли 2,0 г (3,62 ммоль) соединения (V) и 40 мл абс. дихлорэтана. К раствору добавляли 0,6 мл (5 ммоль) SnCl<sub>4</sub> в 10 мл абс. дихлорэтана и оставляли гомогенную смесь на 16 ч при 20°. Добавляли 100 мл хлороформа и 50 мл насыщенного раствора NaHCO<sub>3</sub> и перемешивали 20 мин при 20°. Смесь фильтровали, органический слой отделяли, последовательно промывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (30 мл), водой (30 мл), сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали досуха. Остаток кристаллизовался при добавлении эфира. Выход 1,85 г (83%). Т.пл. 151–153°, *R<sub>f</sub>* 0,30 (В). Найдено, %: С 60,42; Н 4,40; N 9,28. С<sub>31</sub>Н<sub>26</sub>Н<sub>4</sub>О<sub>10</sub>. Вычислено, %: С 60,59; Н 4,26; N 9,12.

1-(2',3'-Ди-*O*-бензоил-5'-*O*-*n*-нитробензоил-6'-дезоксид-β-*D*-аллофуранозил)урацил (IX). А. Суспензию 0,56 г (5 ммоль) сухого урацила в 5 мл гексаметилдисилазана и 0,2 мл триметилхлорсилана кипятили с обратным холодильником без доступа влаги воздуха до полного растворения (~6 ч), упаривали досуха, к остатку добавляли 2,0 г (3,62 ммоль) соединения (V) и 40 мл абс. дихлорэтана. К раствору добавляли 0,6 мл (5 ммоль) SnCl<sub>4</sub> в 10 мл дихлорэтана и оставляли гомогенную смесь на 16 ч при 20°. Добавляли 100 мл хлороформа и 50 мл насыщенного раствора NaHCO<sub>3</sub> и перемешивали 20 мин при 20°. Органический слой отделяли, последовательно промывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (30 мл), водой (2×30 мл), сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и упаривали. Остаток хроматографировали на силикагеле (100 г) в системе А. Фракции, содержащие продукт, упаривали досуха и остаток перекристаллизовывали из спирта. Выход 1,3 г (58%). Т.пл. 159–160°. *R<sub>f</sub>* 0,70 (В). Найдено, %: С 60,29; Н 4,20;



N 7,01.  $C_{31}H_{25}N_3O_{11}$ . Вычислено, %: C 60,49; H 4,09; N 6,83. Спектр ПМР в  $CDCl_3$ ,  $\delta$ : 9,13 с (1H; NH); 8,23 с (4H;  $NO_2Bz$ ); 7,95–7,25 м (10H; 2Bz); 7,15 д (1H,  $J$  8,0; 6-H); 6,10–5,50 м (5H, 5-H, 1', 2', 3' и 5'-H); 4,49 т (1H,  $J$  5,0; 4'-H); 1,57 д (3H,  $J$  6,5;  $C_{(6)}H_3$ ).

Вторым элюированным системой А продуктом являлся 3-(2',3'-ди-О-бензоил-5'-О-*n*-нитробензоил-6'-дезоксид- $\beta$ -D-аллофуранозил)урацил (X). Выход 0,31 г (18%). Т.пл. 134–136° (вода – спирт).  $R_f$  0,55 (B). Найдено, %: C 60,27; H 3,87; N 6,76.  $C_{31}H_{25}N_3O_{11}$ . Вычислено, %: C 60,49; H 4,09; N 6,83. Спектр ПМР в  $CDCl_3$ ,  $\delta$ : 9,72 с (1H; NH); 8,07 д (4H,  $J$  2,0;  $NO_2Bz$ ); 7,90–7,20 м (11H; 2Bz и 6-H); 6,61 д (1H,  $J$  2,0; H-1'); 6,20 м (2H; 2'-H и 3'-H); 5,76 д (1H,  $J$  8,0; 5-H); 4,47 м (1H; 4'-H); 1,51 д (3H,  $J$  6,5;  $C_{(6)}H_3$ ).

Б. Раствор бис(триметилсилил)урацила (из 3 ммоль урацила), 1,2 г (2,25 ммоль) соединения (IV), 0,36 мл (3 ммоль)  $SnCl_4$  в 20 мл абс. дихлорэтана кипятили с обратным холодильником без доступа влаги воздуха 2,5 ч. Соединение (IX) выделяли как в методе А. Выход 0,6 г (43%).

1-(2',3'-Ди-О-ацетил-5'-О-*n*-нитробензоил-6'-дезоксид- $\beta$ -D-аллофуранозил)цитозин (XI). Получали аналогично соединению (VIII) из бис(триметилсилил)цитозина (4,5 ммоль), 1,6 г (3,65 ммоль) соединения (VI), 0,72 мл (6 ммоль)  $SnCl_4$  в 40 мл абс. дихлорэтана, 3 ч при 20°. Выход 1,3 г (73%). Т.пл. 136–138° (эфир).  $R_f$  0,40 (Г). Найдено, %: C 51,30; H 4,56; N 11,08.  $C_{21}H_{22}N_3O_{10}$ . Вычислено, %: C 51,43; H 4,52; N 11,42.

1-(2',3'-Ди-О-ацетил-5'-О-*n*-нитробензоил-6'-дезоксид- $\beta$ -D-аллофуранозил)урацил (XII). Получали аналогично синтезу соединения (IX) из бис(триметилсилил)урацила (4,5 ммоль) и 1,6 г (3,65 ммоль) соединения (VI) в 20 мл абс. дихлорэтана в присутствии 0,5 мл (4 ммоль)  $SnCl_4$  (3 ч, 20°); хроматография на силикагеле (100 г) в системе Б. Выход 0,93 г (52%). Т.пл. 110–112° (спирт).  $R_f$  0,55 (B). Найдено, %: C 51,51; H 4,28; N 8,79.  $C_{21}H_{22}N_3O_{11}$ . Вычислено, %: C 51,33; H 4,31; N 8,55. Спектр ПМР в  $CDCl_3$ ,  $\delta$ : 9,68 с (1H, NH); 8,25 с (4H;  $NO_2Bz$ ); 7,08 д (1H,  $J$  8,0; 6-H); 5,54 д (1H,  $J$  8,0; 5-H); 5,95–5,29 м (4H; 1', 2', 3' и 5'-H); 4,25 м (1H; 4'-H); 2,13 с (6H; 2Ac); 1,45 д (3H,  $J$  6,5;  $C_{(6)}H_3$ ).

Вторым элюированным системой Б продуктом был 3-(2',3'-ди-О-ацетил-5'-О-*n*-нитробензоил-6'-дезоксид- $\beta$ -D-аллофуранозил)урацил (XIII). Выход 0,2 г (11%).  $R_f$  0,50 (B). Найдено, %: C 51,07; H 4,21.  $C_{21}H_{22}N_3O_{11}$ . Вычислено, %: C 51,33; H 4,31. Спектр ПМР в  $CDCl_3$ ,  $\delta$ : 9,80 с (1H; NH); 8,25 с (4H;  $NO_2Bz$ ); 8,01 д (1H,  $J$  8,0; 6-H); 6,37 с (1H; 1'-H); 5,90 м (2H; 2' и 3'-H); 5,67 д (1H,  $J$  8,0; 5-H); 5,47 м (1H; 5'-H); 4,24 м (1H, 4'-H); 2,09 с (3H; Ac); 1,99 с (3H; Ac); 1,42 д (3H,  $J$  6,5;  $C_{(6)}H_3$ ).

9-(6'-Дезокси- $\beta$ -D-аллофуранозил)аденин (XIV). Раствор 0,74 г (1 ммоль) соединения (VII) в 20 мл метанола, полунасыщенного при 0° аммиаком, оставляли на 16 ч при 20° и упаривали в вакууме досуха. К остатку добавляли 20 мл эфира, осадок отфильтровывали и промывали эфиром. Осадок растворяли в 20% водном спирте и наносили на колонку с дауэксом-50 ( $H^+$ -форма, объем 20 мл), колонку промывали 20% водным спиртом, затем водой до отсутствия УФ-поглощающего материала и элюировали 2,5% водным аммиаком. Фракции (по УФ-поглощению) упаривали до малого объема и лиофилизировали. Полученный порошок перекристаллизовывали из смеси спирт – вода – эфир. Выход 0,24 г (85%). Т.пл. 133° (разл.).  $R_f$  0,25 (Г). Спектр ПМР в  $D_2O$ ,  $\delta$ : 8,16 с (1H; 8-H); 7,69 с (1H, 2-H); 5,90 д (1H,  $J$  7,0; 1'-H); 4,75 м (1H; 2'-H); 4,45 м (1H; 3'-H); 4,14 м (2H, 4' и 5'-H); 1,29 д (3H,  $J$  6,5;  $C_{(6)}H_3$ ). УФ-спектр, нм( $\epsilon$ ):  $\lambda_{\max}^{pH 1}$  257 (14900),

$\lambda_{\max}^{pH 7}$  260 (15000),  $\lambda_{\max}^{pH 13}$  260 (15100). Лит. данные [20]: т.пл. 134–135° (разл.).

1-(6'-Дезокси- $\beta$ -D-аллофуранозил)цитозин (XV). Раствор 0,61 г (1 ммоль) соединения (VIII) в 20 мл метанола, полунасыщенного при 0°

аммиаком, оставляли на 16 ч при 20°, упаривали досуха, к остатку добавляли 20 мл эфира, осадок отфильтровывали, промывали эфиром и перекристаллизовывали из смеси спирт — вода — эфир. Выход 0,19 г (74%). Т.пл. 235—236°.  $R_f$  0,03 (Г). Спектр ПМР приведен на рис. 1. УФ-спектр, нм ( $\epsilon$ ):  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 4}$  280 (12700),  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 7}$  272 (9300),  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 13}$  272 (9300). Найдено, %: С 46,82; Н 6,01; N 16,08.  $C_{10}H_{15}N_3O_5$ . Вычислено, %: С 46,69; Н 5,88; N 16,33.

Соединение (XV) было также получено гидролизом нуклеозида (XI) в аналогичных условиях, выход 70%.

Приведенным выше методом получены:

*1-(6'-Дезокси- $\beta$ -D-аллофуранозил)урацил (XVI)*. Выход 78%. Т.пл. 211—212°.  $R_f$  0,20 (Г). Найдено, %: С 46,45; Н 5,38; N 11,02.  $C_{10}H_{14}N_2O_6$ . Вычислено, %: С 46,51; Н 5,46; N 10,85. Спектр ПМР приведен на рис. 1.

УФ-спектр, нм ( $\epsilon$ ):  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 4}$  263 (9900),  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 7}$  263 (10000),  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 13}$  262 (6600).

*3-(6'-Дезокси- $\beta$ -D-аллофуранозил)урацил (XVII)*. Выход 73%. Т.пл. 211—212°.  $R_f$  0,21 (Г). Найдено, %: С 46,48; Н 5,40.  $C_{10}H_{14}N_2O_6$ . Вычислено, %: С 46,51; Н 5,46. Спектр ПМР в  $D_2O$ ,  $\delta$ : 7,51 д (1H,  $J$  8,0; 6-H), 6,30 д (1H,  $J$  5,0; 1'-H); 5,84 д (1H,  $J$  8,0; 5-H); 4,80—4,00 м (4H, 2', 3', 4', 5'-H);

1,24 д (3H,  $J$  6,5;  $C_{(6)}H_3$ ). УФ-спектр, нм ( $\epsilon$ ):  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 4}$  264 (9100),  $\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 7}$  264 (9100).

$\lambda_{\text{макс}}^{\text{pH } 13}$  288 (10300).

Соединения (XVI) и (XVII) были также получены в аналогичных условиях из соединений (XII) и (XIII) с выходами 76 и 62% соответственно.

*1-(2', 3'-О-Изопропилиден-6'-дезоксид- $\beta$ -D-аллофуранозил)урацил (XVIII)*. Смесь 85 мг (0,33 ммоль) соединения (XVI), 10 мл сухого ацетона и 0,1 мл трифторуксусной кислоты перемешивали 16 ч при 20°, при охлаждении до 0° добавляли 0,5 мл триэтиламина и упаривали досуха. Остаток упаривали с водой (3×10 мл), добавляли 50 мл хлороформа и 20 мл воды, органический слой отделяли, упаривали досуха, добавляли 20 мл эфира и оставляли на 16 ч при 0°. Кристаллический осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из воды. Выход 78 мг (80%). Т.пл. 211—212°.  $R_f$  0,35 (В). Найдено, %: С 52,33; Н 6,12.  $C_{13}H_{18}N_2O_6$ . Вычислено, %: С 52,34; Н 6,08. Спектр ПМР в  $D_2O$ ,  $\delta$ : 7,83 д (1H,  $J$  8,0; 6-H); 6,02 д (1H,  $J$  2,5; 1'-H); 5,98 д (1H,  $J$  8,0; 5-H); 5,26 м (1H,  $J$  2,5 и 7,0; 1'-H); 5,20 м (1H,  $J$  7,0 и 3,0; 3'-H), 4,23 м (2H; 4' и 5'-H); 1,77 с (3H, Me); 1,58 с (3H, Me); 1,23 д (3H,  $J$  6,5;  $C_{(6)}H_3$ ).

Авторы благодарят И. Д. Бобрусина, М. Ю. Покровскую, В. М. Орлова за съемку и интерпретацию ПМР- и масс-спектров и ценные критические замечания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Михайлов С. Н. (1978) Биоорган. химия, 4, 639—644.
2. Smart J., Mikhailov S. N., Florentiev V. L. (1975) Collect. Chech. Chem. Commun, 40, 3399—3403.
3. Mikhailov S. N., Kolobushkina L. I., Kritzyn A. M., Florentiev V. L. (1976) Tetrahedron, 32, 2409—2415.
4. Крицын А. М., Михайлов С. Н., Мишарин А. Ю., Падюкова Н. Ш., Флорентьев В. Л. (1976) Биоорган. химия, 2, 1338—1350.
5. Holý A., Černá J., Rychlík I. (1974) Nucleic Acids Res., 1, 1221—1231.
6. Аврамова Э. В. (1975) Канд. дис. «Молекулярные основы специфичности рибонуклеазы А», М.
7. Прасолов В. С., Крицын А. М., Михайлов С. Н., Флорентьев В. Л. (1975) Докл. АН СССР, 221, 1226—1228.
8. Kravetsky A. A., Kukhanova M. K., Gottikh V. P. (1975) Nucleic Acids Res., 2, 2223—2236.

9. Козлов И. А., Метельская В. А., Михайлов С. Н., Новикова И. Ю., Флорентьев В. Л. (1978) Биохимия, 43, 702-707.
10. Антонов И. В., Дудкин С. М., Карпейский М. Я., Платонов А. Л., Протасевич И. И., Яковлев Г. И., Чернавский Д. С. (1978) Биоорг. химия, 4, 388-396.
11. Walton E., Jenkins S. R., Nutt R. F., Zimmerman M., Holly F. M. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 4524-4525.
12. Nutt R. F., Walton E. (1968) J. Med. Chem., 11, 151-153.
13. Nutt R. F., Dickson M. J., Holly F. M., Walton E. (1968) J. Org. Chem., 33, 1789-1795.
14. Jenkins S. R., Arison B., Walton E. (1968) J. Org. Chem., 33, 2490-2494.
15. Walton E., Jenkins S. R., Nutt R. F., Holly F. M. (1969) J. Med. Chem., 12, 306-309.
16. Jenkins S. R., Walton E. (1973) Carbohydr. Res., 26, 71-81.
17. Reist E. J., Goodman L., Spencer R. R., Baker B. R. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 3962-3966.
18. Reist E. J., Goodman L., Baker B. R. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 5775-5779.
19. Ranganathan R. S., Jones G. H., Moffat J. G. (1974) J. Org. Chem., 39, 290-298.
20. Howgate P., Hampton A. (1972) Carbohydr. Res., 21, 309-315.
21. Hampton A., Howgate P., Harper P. J., Perini F., Kappler F., Preston R. K. (1973) Biochemistry, 12, 3328-3332.
22. Lerner L. M. (1978) J. Org. Chem., 43, 962-965.
23. Levene P. A., Compton J. (1936) J. Biol. Chem., 116, 169-177.
24. Бэйкер Б. Р. (1967) Методы химии углеводов, с. 210-212, М.
25. Stevens J. D., Fletcher H. G. (1968) J. Org. Chem., 33, 1799-1805.
26. Niedballa U., Vorbrüggen H. (1974) J. Org. Chem., 39, 3654-3660.
27. Niedballa U., Vorbrüggen H. (1974) J. Org. Chem., 39, 3672-3674.
28. Lichtenthaler F. W., Voss P., Heerd A. (1974) Tetrahedron Lett., 2141-2144.
29. Niedballa U., Vorbrüggen H. (1976) J. Org. Chem., 41, 2084-2086.
30. Deiongh D. C. (1973) in: Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry, v. 2, p. 145-176, Wiley - Interscience.
31. Albert A. (1973) in: Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry, v. 2, p. 47-123, Wiley - Interscience.
32. Imbach J. L. (1975) Ann N. Y. Acad. Sci., 255, 177-184.
33. Mackenzie G., Shaw G. (1977) J. Chem. Soc. Commun., 753-754.
34. Miles D. W., Inskoop W. H., Robins M. J., Winkley M. W., Robins R. K., Eyring H. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 3873-3884.
35. Ingwall J. S. (1972) J. Chem. Soc., 94, 5487-5495.

Поступила в редакцию  
5.XII.1978

## NUCLEOTIDE CONFORMATIONAL ANALOGS. V. SYNTHESIS OF 5'-C-METHYLNUCLEOSIDES ON THE BASIS OF 6-DEOXY-D-ALLOSE

KARPEISKY M. Ya., MIKHAILOV S. N.

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

The nucleoside analogs were synthesized on the basis of 6-deoxy-D-allose. Acid hydrolysis of methyl-2,3-O-isopropylidene-5-O-p-nitrobenzyl-6-deoxy-β-D-allofuranoside followed by benzylation and acetolysis afforded 1-O-acetyl-2,3-di-O-benzoyl-5-O-p-nitrobenzoyl-6-deoxy-D-allofuranose. Condensation of the latter with uracil, cytosine or N<sup>6</sup>-benzoyladenine trimethylsilyl derivatives in dichloroethane in the presence of SnCl<sub>4</sub> resulted in peracylated 5'-C-methylnucleosides, which were also prepared by glycosylating 1,2,3-tri-O-acetyl-5-O-p-nitrobenzoyl-6-deoxy-D-allofuranose. After the removal of the protecting acyl groups, the 5'-C-methyl analogs of uridine, cytidine and adenosine were obtained.