



УДК 577.113.6

# НОВЫЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ АНАЛОГА КЭП-СТРУКТУРЫ С ПРАВИЛЬНОЙ ОРИЕНТАЦИЕЙ (ANTI-REVERSE CAP ANALOG, ARCA) <sup>2m</sup>GpppG

© 2024 г. А. Л. Каюшин\*, #, К. В. Антонов\*, Е. В. Дорофеева\*, М. Я. Берзина\*,  
А. О. Арнаутова\*, И. А. Прохоренко\*, А. И. Мирошников\*, И. Д. Константинова\*

\* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 14.09.2023 г.

После доработки 27.09.2023 г.

Принята к публикации 28.09.2023 г.

Предложен новый подход к синтезу ARCA (Anti-Reverse Cap Analog) классической структуры – диметилированного динуклеотида гуанозина <sup>2m</sup>GpppG. Традиционный подход к его получению состоит в конденсации активированного 5'-дифосфата 7,3'-O-диметилгуанозина с 5'-монофосфатом гуанозина. Мы предлагаем использовать 3'-O-метилгуанозин только для синтеза 5'-монофосфата диметилированного гуанозина, а в конденсацию вводить активированный 5'-дифосфат гуанозина. Определены условия фосфорилирования 3'-O-метилгуанозина, позволяющие избежать образования побочного 3'-O-метил-5'-дезоксигуанозин-2'-фосфата. ARCA синтезирован с высоким выходом (89% на стадии конденсации). Разработанный нами вариант синтеза легко масштабируется и удобен для получения граммовых количеств ARCA.

*Ключевые слова:* ARCA, <sup>2m</sup>GpppG, имидазол, гуанозин

**DOI:** 10.31857/S0132342324010015, **EDN:** QSYRGR

## ВВЕДЕНИЕ

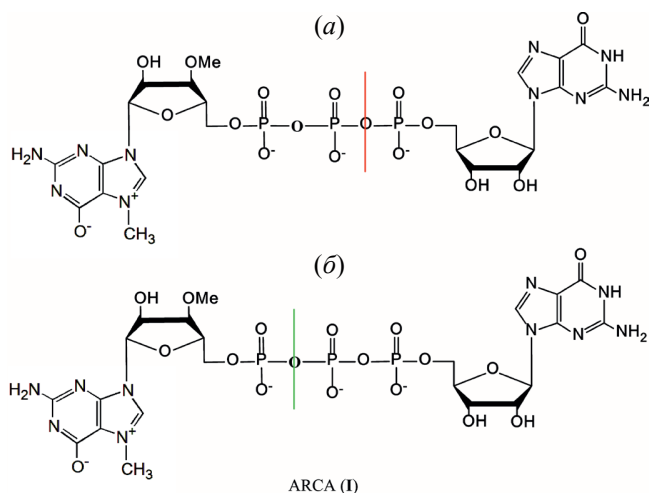
Процессинг эукариотических мРНК начинается с образования на 5'-конце так называемой кэп-структуры – 7-метилгуанозина, присоединенного через трифосфатный мостик к первому нуклеотиду (А или G) цепи РНК. В клетке кэп играет важнейшую роль в функционировании РНК – регулирует процессы трансляции, сплайсинга и межклеточного транспорта. Эффективность выполняемых функций

напрямую зависит от структуры кэпа и количества метилированных участков.

Синтезировано и изучено большое число аналогов природного N7-метилгуанозинового кэпа [1–5], но исследователи отдают предпочтение работе с метилированным по N7 и O3' атомам динуклеотида гуанозина <sup>2m</sup>GpppG (рис. 1) [1–5]. Этот кэп можно получить химическим синтезом, предложенным Stepinski et al. в 2001 г. [4].

Сокращения: CDI – карбонилдиимидазол; ARCA – аналог кэп-структуры с правильной ориентацией (Anti-Reverse Cap Analog).

#Автор для связи: (тел.: +7 (916) 686-45-03; эл. почта: kayushin.alexey@yandex.ru).



**Рис. 1.** Сайты конденсации при получении ARCA (**I**): (а) – классический вариант [5] (красная линия); (б) – предложенный нами (зеленая линия).

Общепринятая стратегия синтеза динуклеотидов ARCA (Anti-Reverse Cap Analog) заключается в следующем: 1) получение 5'-полифосфата (в простейшем случае – дифосфата) одного из нуклеозидов; 2) получение 5'-моно- или полифосфата второго нуклеозида; 3) активация одного из этих фосфатов (обычно через фосфоимидазолид) и последующая конденсация с образованием, например, P<sup>1</sup>,P<sup>3</sup>-трифосфата или P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-тетрафосфата динуклеотида [1–5].

Как правило, в синтезе динуклеотидов ARCA используется 5'-дифосфат 7-метилгуанозина или его производных по 2'- или 3'-положению (см., например, работы [1–5]) и имидазолид 5'-монофосфата гуанозина (рис. 1а). Однако нуклеотиды, содержащие 7-метилгуанозин, менее стабильны по сравнению с неметилированными нуклеотидами. Кроме того, 3'-O-метилгуанозин – недешевый препарат. Поэтому желательно свести к минимуму число реакций, в которых он участвует.

Основная цель данного исследования – разработка простого и эффективного способа синтеза ARCA, который можно было бы легко масштабировать до получения граммовых количеств

динуклеотида гуанозина <sup>2m</sup>GpppG в лабораторных условиях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем случае нужно было ответить на два вопроса: во-первых, 5'-дифосфат какого нуклеозида мы получаем – гуанозина или 7,3'-O-диметилгуанозина, и, во-вторых, какой фосфат мы активируем на стадии конденсации – дифосфат или монофосфат (рис. 1).

На последней стадии синтеза мы использовали активированный 5'-дифосфат гуанозина (**IV**) и 5'-монофосфат 7,3'-O-диметилгуанозина (**VI**). Схема синтеза динуклеотида ARCA (**I**) приведена на рис. 2.

Мононуклеотид (**II**) получали обработкой суспензии гуанозина в триэтилфосфате хлорокисью фосфора. В работе Yoshikawa et al. [6] для получения мононуклеотида (**II**) в качестве растворителя использовали триметилфосфат и добавляли воду для предотвращения образования 5',2'- или 5',3'-дифосфатов; в наших условиях дифосфаты не образовывались. Мононуклеотид (**II**) выделяли из реакционной смеси с помощью ионообменной хроматографии в виде триэтиламмониевой соли с выходом 72%.

Взаимодействием мононуклеотида (**II**) с карбонилдиимидазолом в DMF получали соответствующий имидазолид, который без выделения обрабатывали триэтиламмониевой солью ортофосфорной кислоты (получена *in situ* из 1 экв. триэтиламина и 1 экв. кислоты) с образованием 5'-дифосфата (**III**). В качестве катализатора реакции использовали хлористый цинк [7]. Соединение (**III**) выделяли из реакционной смеси с помощью ионообменной хроматографии в виде триэтиламмониевой соли с выходом 57%.

Триэтиламмониевая соль соединения (**IV**) была получена из соединения (**III**) известным методом с использованием 2,2'-дитиодипиридина, трифенил-

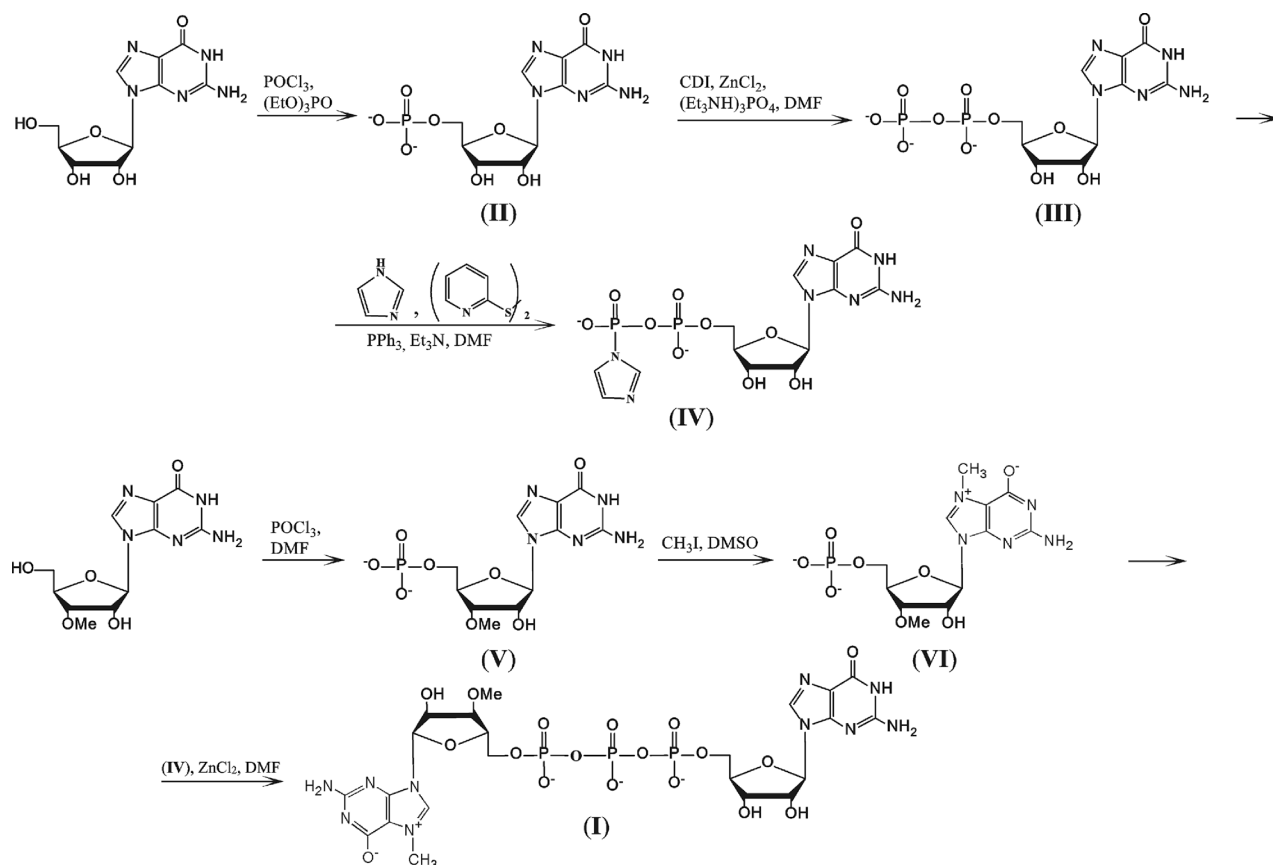
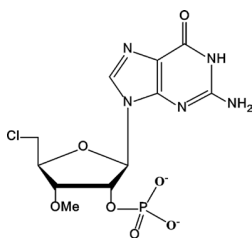


Рис. 2. Схема синтеза ARCA (I).

фосфина, имидазола и триэтиламина [1–5] с выходом 73%. Таким образом, мы синтезировали первый компонент для последней стадии синтеза соединения (I).

Следующим этапом работы был синтез 5'-монофосфата 7,3'-*O*-диметилгуанозина (V). Вначале мы попытались фосфорилировать 3'-*O*-метилгуанозин по той же методике, что и гуанозин, но помимо целевого продукта неожиданно получили 3'-*O*-метил-5'-дезокси-5'-хлоргуанозин-2'-фосфат (VII) с выходом 18%. Состав этого соединения подтверждается данными масс-спектропии – два положительных иона с  $m/z [M + \text{H}]^+$  396.0469 (100%  $^{35}\text{Cl}$ ) и 398.0440 (31.8%  $^{37}\text{Cl}$ ), вычислено 396.0476 (100%) и 398.0446 (32.0%) соответственно. Местоположение фосфатной группы и атома хлора установлено анализом данных ЯМР.

Как следует из данных ЯМР, ароматическая структура остатка гуанина не нарушена, следовательно, модификация прошла по остатку рибозы. Сдвиг сигнала C5' в сильное поле (44.80 м.д. вместо обычных для 5'-фосфатов гуанозина 63–65 м.д.) указывает на то, что этот атом соединен с атомом более электроотрицательным, чем атом кислорода фосфатной группы. Сигналы атомов C1', C2' и C3' расщеплены в дублеты ( $J_{\text{C1}'-\text{P}} = 5.0$ ,  $J_{\text{C2}'-\text{P}} = 3.8$  и  $J_{\text{C3}'-\text{P}} = 2.1$  Гц) – это характерно для атомов углерода, непосредственно соединенных с атомом кислорода фосфатной группы, и для соседних атомов углерода. Эти факты и результаты анализа двумерных спектров ЯМР однозначно подтверждают структуру соединения (VII) (рис. 3).



(VII)

**Рис. 3.** Структура побочного продукта (VII) в синтезе 5'-монофосфата 7,3'-*O*-диметилгуанозина (V).

Триэтиламмониевая соль соединения (V) была получена тем же методом, что и соединение (II), но без удаления избытка  $\text{POCl}_3$ . Выход составил 69%, соединение (VII) не образовывалось. Метилированием соединения (V) в условиях, описанных в работе Jemielity et al. [5], получили триэтиламмониевую соль соединения (VI) с выходом 83%.

Наконец, конденсацией соединений (IV) и (VI) в присутствии  $\text{ZnCl}_2$  синтезировали ARCA (I) в виде триэтиламмониевой соли. После перевода этой соли в натриевую выход составил 89%.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы Sigma (США) и Aldrich (США) без дополнительной очистки, 3'-*O*-метилгуанозин (Shanghai Macklin Biochemical Co., Ltd., КНР), DEAE-Sephadex A-25 и CM-Sephadex C-25 (Pharmacia, Швеция), Toyopearl DEAE-650M (Tosoh Corporation, Япония). Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Avance DRX-700 (Bruker, Германия) в  $\text{DMSO}-d_6$  или в  $\text{D}_2\text{O}$  при 303 К. Рабочая частота для  $^1\text{H}$ -ЯМР – 700 МГц, для  $^{13}\text{C}$  – 176 МГц, для  $^{15}\text{N}$  – 71 МГц. Химические сдвиги измеряли в м.д. ( $\delta$ ) относительно остаточных сигналов протонов  $\text{DMSO}$  (2.50 м.д.) или  $\text{D}_2\text{O}$  (4.79 м.д.) в качестве внутреннего стандарта. Константы спин-спинового взаимодействия ( $J$ ) измеряли в Гц.

Хромато-масс-спектрометрию проводили в системе Agilent 6210 TOF LC/MS (Agilent Technologies, США).

**Гуанозин-5'-монофосфат, триэтиламмониевая соль (II).** Суспензию 1 г (3.5 ммоль) гуанозина в 10 мл триэтилфосфата охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и при интенсивном перемешивании добавляли 1.3 мл (14.1 ммоль)  $\text{POCl}_3$ . Инкубировали 3 ч при  $0^\circ\text{C}$  и 6 ч при  $6^\circ\text{C}$ . Избыток  $\text{POCl}_3$  отгоняли, добавляли 25 мл 1 М ТЕАВ и оставляли на 16 ч при комнатной температуре. Добавляли 50 мл воды и наносили на колонку ( $3 \times 17$  см) с DEAE-Sephadex A-25 ( $\text{HCO}_3^-$ -форма). Элюировали градиентом концентрации ТЕАВ (0.05–0.45 М, 1 л, скорость потока 6 мл/мин). Фракции, содержавшие искомым продукт, объединяли, упаривали, остатки триэтиламина удаляли соупариванием с этанолом ( $3 \times 100$  мл) и лиофилизировали. Выход 1.43 г (2.53 ммоль, 72%).

Вычислено для аниона  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_8\text{P} [M - \text{H}]^-$  362.0507, найдено 362.0736.

$^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 7.96 (с, 1H, H8), 6.61 (с, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.69 (д,  $J$  6.5, 1H, H1'), 4.57–4.55 (м, 1H, H2'), 4.18–4.17 (м, 1H, H3'), 3.99–3.98 (м, 1H, H4'), 3.88–3.85 (м, 1H, H5'), 3.83–3.80 (м, 1H, H5').

$^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 157.31 (C6), 154.24 (C2), 151.98 (C4), 136.25 (C8), 117.00 (C5), 86.80 (C1'), 74.07 (C2'), 84.55 (д,  $J$  7.6, C4'), 71.51 (C3'), 64.67 (д,  $J$  4.1, C5').

$^{15}\text{N}$ -ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 248.69 (N7), 169.79 (N9), 73.18 (NH<sub>2</sub>).

**Гуанозин-5'-дифосфат, триэтиламмониевая соль (III).** К раствору 98 мг (1 ммоль) безводной  $\text{H}_3\text{PO}_4$  в 10 мл DMF добавляли 140 мкл (1 ммоль) триэтиламина и выдерживали 30 мин (раствор I). К суспензии 114 мг (0.2 ммоль) соединения (II) в 4 мл DMF добавляли 162 мг (1 ммоль) CDI и через 1.5 ч добавляли раствор I. К получившейся суспензии

добавляли раствор 166 мг (1.2 ммоль) ZnCl<sub>2</sub> в 2 мл DMF и оставляли при интенсивном перемешивании на 16 ч. Упаривали досуха, растворяли в 30 мл воды и выливали в суспензию 500 мг (1.69 ммоль) EDTA в 30 мл воды. Нейтрализовали насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> и наносили на колонку (2 × 18 см) с Toyopearl DEAE-650M (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма). Элюировали градиентом концентрации TEAB (0–0.3 М, 800 мл, скорость потока 7 мл/мин). Фракции, содержавшие целевое соединение, объединяли, упаривали, остатки триэтиламина удаляли соупариванием с этанолом (3 × 100 мл) и лиофилизировали. Выход 72 мг (0.11 ммоль, 57%).

Вычислено для аниона C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub> [M – H]<sup>-</sup> 442.0171, найдено 442.0580.

<sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 8.07 (с, 1H, H8), 5.89 (д, J 6.1, 1H, H1'), 4.72 (дд, J 5.4, 11.3, 1H, H2'), 4.49 (дд, J 3.6, 5.0, H3'), 4.31 (м, 4.32–4.30, H4'), 4.17 (м, 4.17–4.15, 2H, H5').

<sup>13</sup>C-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 158.97 (C6), 153.95 (C2), 151.78 (C4), 137.66 (C8), 116.22 (C5), 86.84 (C1'), 83.84 (д, J 9.0, C4'), 73.74 (C2'), 70.41 (H4'), 65.11 (д, J 5.7, C5').

<sup>15</sup>N-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 235.72 (N7), 167.93 (N9).

**R<sup>2</sup>-Имидазолид гуанозин-5'-дифосфата, триэтиламмониевая соль (IV).** К суспензии 260 мг (0.40 ммоль) соединения (III) в 5 мл DMF при интенсивном перемешивании добавляли 136 мг (2 ммоль) имидазола, 176 мг (0.8 ммоль) 2,2'-дитиодипиридина, 56 мкл (0.4 ммоль) триэтиламина и 208 мг (0.8 ммоль) трифенилфосфина. Через 16 ч высаживали при 0°C в 30 мл ацетона, содержавшего 200 мг NaClO<sub>4</sub>. Центрифугировали при 5000 g, осадок промывали холодным ацетоном (3 × 15 мл) и высушивали в вакууме. Выход 174 мг (73%).

Вычислено для аниона C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub> [M – H]<sup>-</sup> 492.0439, найдено 492.0434.

<sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.75 (с, 1H, H1), 7.89 (с, 1H, H8), 7.82 (с, 1H, H5''), 7.23 (с, 1H, H4''), 6.86 (с, 1H, H2''), 6.64 (с, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.67 (д, J 6.1, H1'), 4.55–4.54 (м, 1H, H2'), 4.17–4.16 (м, 1H, H3'), 3.95–3.93 (м, 1H, H4'), 3.87–3.84 (м, 1H, H5'), 3.79–3.76 (м, 1H, H5').

<sup>13</sup>C-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 156.84 (C6), 153.60 (C2), 151.32 (C4), 139.16 (д, J 5.3, C5''), 136.08 (C8), 127.48 (д, J 7.7, C2''), 120.20 (д, J 5.5, C4''), 116.78 (C5), 86.77 (C1'), 83.57 (д, J 7.5, C4'), 73.02 (C2'), 70.45 (C3'), 64.85 (д, J 3.0, C5').

<sup>15</sup>N-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 258.52 (N1''), 248.66 (N7), 194.09 (N3''), 169.62 (N9).

**3'-O-Метилгуанозин-5'-монофосфат, триэтиламмониевая соль (V).** Суспензию 200 мг (0.67 ммоль) 3'-O-метилгуанозина в 5 мл триэтилфосфата охлаждали до 0°C и при интенсивном перемешивании добавляли 0.3 мл (3.35 ммоль) POCl<sub>3</sub>. Инкубировали 2 ч при 0°C, добавляли 10 мл воды, нейтрализовали насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> и наносили на колонку (3 × 17 см) с DEAE-Sephadex A-25 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма). Элюировали градиентом концентрации TEAB (0.05–0.45 М, 1.4 л, скорость потока 7 мл/мин). Фракции, содержавшие искомый продукт, объединяли, упаривали, остатки триэтиламина удаляли соупариванием с этанолом (3 × 100 мл) и лиофилизировали. Выход 266 мг (0.46 ммоль, 69%).

Вычислено для аниона C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>P [M – H]<sup>-</sup> 376.0664, найдено 376.0588.

<sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 7.93 (с, 1H, H8), 6.76 (с, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.69 (д, J 6.4, 1H, H1'), 4.65–4.63 (м, 1H, H2'), 4.10–4.08 (м, 1H, H4'), 3.91–3.88 (м, 1H, H5'), 3.84–3.83 (м, 1H, H5'), 3.83–3.82 (м, 1H, H4'), 3.41 (с, 3H, O-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 157.14 (C6), 154.43 (C2), 151.96 (C4), 136.95 (C8), 116.98 (C5), 86.81 (C1'), 73.38 (C2'), 81.82 (C4'), 80.64 (C3'), 64.85 (д, J 5.2, C5'), 58.17 (OCH<sub>3</sub>).

$^{15}\text{N}$ -ЯМР (DMSO- $d_6$ ): 249.93 (N7), 169.22 (N9), 75.10 (NH $_2$ ).

**7,3'-О-Диметилгуанозин-5'-монофосфат, триэтиламмониевая соль (VI).** К раствору 200 мг (0.35 ммоль) соединения (V) в 3.5 мл DMSO добавляли 0.7 мл (12 ммоль) CH $_3$ I. Через 3 ч выливали в 100 мл ледяной воды и экстрагировали эфиром до исчезновения желтой окраски (5 × 50 мл). Водный слой нейтрализовали насыщенным водным раствором NaHCO $_3$  и наносили на колонку (2 × 18 см) с Toyopearl DEAE-650M (HCO $_3^-$ -форма). Элюировали градиентом концентрации TEAB (0–0.2 М, 800 мл, скорость потока 5 мл/мин). Фракции, содержавшие целевое соединение, объединяли, упаривали, остатки триэтиламина удаляли соупариванием с этанолом (3 × 100 мл) и лиофилизировали. Выход 143 мг (0.30 ммоль, 83%).

Вычислено для C $_{12}$ H $_{19}$ N $_5$ O $_8$ P [M + H] $^+$  392.0971, найдено 392.0976.

$^1\text{H}$ -ЯМР (DMSO- $d_6$ ): 9.58 (с, 1H, H8), 7.50 (с, 2H, NH $_2$ ), 5.82 (уш.сигн, 1H, H1'), 4.66 (уш.сигн, 1H, H2'), 4.16–4.15 (м, 1H, H4'), 4.04–4.02 (м, 1H, H5'; м, 1H, H4'), 4.00 (с, 3H, N-CH $_3$ ), 3.84–3.83 (м, 1H, H5'), 3.37 (с, 3H, O-CH $_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (DMSO- $d_6$ ): 158.88 (C6), 149.80 (C4), 136.06 (C8), 107.74 (C5), 89.84 (C1'), 82.70 (д, J 7.6, C4'), 78.80 (C3'), 73.45 (C2'), 62.96 (д, J 3.8, C5'), 58.07 (O-CH $_3$ ), 35.92 (N-CH $_3$ ).

$^{15}\text{N}$ -ЯМР (DMSO- $d_6$ ): 159.80 (N7).

**P $^1$ -Гуанозин-5'-P $^3$ -(7,3'-О-диметилгуанозин-5')-трифосфат (натриевая соль) (I).** К суспензии соединений (VI) (104 мг, 0.21 ммоль) и (IV) (111 мг, 0.16 ммоль) в 3 мл DMF добавляли раствор 250 мг (1.84 ммоль) ZnCl $_2$  в 1 мл DMF. Через 16 ч прозрачный раствор выливали в суспензию 800 мг (2.72 ммоль) EDTA в 50 мл воды. Нейтрализовали насыщенным водным раствором NaHCO $_3$  и наносили на колонку

(2 × 18 см) с Toyopearl DEAE-650M (HCO $_3^-$ -форма). Элюировали градиентом концентрации TEAB (0–0.3 М, 800 мл, скорость потока 5 мл/мин). Фракции, содержавшие целевое соединение, объединяли, упаривали, остатки триэтиламина удаляли соупариванием с этанолом (3 × 100 мл). Сухой остаток растворяли в 10 мл воды, наносили на колонку (1.5 × 12 см) с CM-Sephadex C-25 (Na $^+$ -форма) и элюировали водой (скорость потока 0.5 мл/мин). Элюат лиофилизировали. Выход 165 мг (0.19 ммоль, 89%).

Вычислено для аниона C $_{22}$ H $_{30}$ N $_{10}$ O $_{18}$ P $_3$  [M – H] $^-$  815.0958, найдено 815.0859.

$^1\text{H}$ -ЯМР (D $_2$ O): 7.96 (с, 1H, H8-G), 5.85 (д, J 4.1, 1H, H1'- $^{2m}$ G), 5.76 (д, J 6.2, 1H, H1'-G), 4.68 (уш.сигн, 1H, H2'- $^{2m}$ G), 4.66 (уш.сигн, 1H, H2'-G), 4.44 (дд, J 3.6, 5.2, 1H, H3'-G), 4.42–4.39 (м, 1H, H4'- $^{2m}$ G), 4.38–4.33 (м, 1H, H5'- $^{2m}$ G), 4.32–4.29 (м, 1H, H4'-G), 4.27–4.23 (м, 1H, H5'-G), 4.21–4.20 (м, 1H, H5'- $^{2m}$ G), 4.20–4.19 (м, 1H, H5'-G), 4.10–4.08 (м, 1H, H3'- $^{2m}$ G), 4.03 (с, 3H, N-CH $_3$ ), 3.45 (с, 3H, O-CH $_3$ ).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (D $_2$ O): 158.49 (C6-G), 137.53 (C8-G), 151.52 (C4-G), 149.35 (C4'- $^{2m}$ G), 137.53 (C8-G), 136.34 (C8- $^{2m}$ G), 116.09 (C5-G), 108.02 (C5'- $^{2m}$ G), 89.68 (C1'- $^{2m}$ G), 86.75 (C1'-G), 83.78 (д, J 8.0, C4'-G), 82.40 (д, J 9.4, C4'- $^{2m}$ G), 78.57 (C3'- $^{2m}$ G), 73.59 (C2'- $^{2m}$ G), 73.53 (C2'-G), 70.33 (C3'-G), 65.46 (д, J 5.3, C5'-G), 64.81 (C5'- $^{2m}$ G), 58.05 (O-CH $_3$ ), 36.09 (N-CH $_3$ ).

$^{15}\text{N}$ -ЯМР (D $_2$ O): 236.72 (N7-G), 168.09 (N9-G), 160.95 (N7- $^{2m}$ G).

$^{31}\text{P}$ -ЯМР (D $_2$ O, 243 Мгц, относительно H $_3$ PO $_4$ ): –11.35 (д, J 17.2, 1P, P $^1$  или P $^3$ ), –11.55 (д, J 18.4, 1P, P $^3$  или P $^1$ ), от –22.84 до –23.26 (м, 1P, P $^2$ ).

**3'-О-Метил-5'-дезоксигуанозин-2'-фосфат, триэтиламмониевая соль (VII).** Суспензию 100 мг (0.34 ммоль) 3'-О-метилгуанозина в 1 мл триэтилфосфата охлаждали до 0°C и при интенсивном

перемешивании добавляли 0.1 мл (1.02 ммоль) POCl<sub>3</sub>. Через 3 ч отгоняли избыток POCl<sub>3</sub>, добавляли 3 мл насыщенного водного раствора NaHCO<sub>3</sub>, 50 мл воды и наносили на колонку (2 × 18 см) с Toyopearl DEAE-650M (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форма). Элюировали градиентом концентрации TEAB (0–0.2 М, 800 мл, скорость потока 5 мл/мин). Фракции, содержавшие целевое соединение, объединяли, упаривали, остатки триэтиламина удаляли соупариванием с этанолом (3 × 100 мл) и лиофилизировали. Выход 33 мг (0.06 ммоль, 18%).

Вычислено для C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P [M + H]<sup>+</sup> 396.0476, 398.0446, найдено 396.0469, 398.0440.

<sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 9.42 (уш. сигн, 1H, H1), 7.88 (с, 1H, H8), 6.62 (с, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.90 (д, *J* 5.4, 1H, H1'), 5.12–5.09 (м, 1H, H2'), 4.18–4.16 (м, 1H, H3'), 4.12–4.09 (м, 1H, H4'), 3.90–3.87 (м, 1H, H5'), 3.80–3.78 (м, 1H, H5'), 3.47 (с, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 156.70 (C6), 153.70 (C2), 151.27 (C4), 135.87 (C8), 116.60 (C5), 85.73 (д, *J* 5.0, C1'), 81.46 (C4'), 79.15 (д, *J* 2.1, C3'), 73.49 (д, *J* 3.8, C2'), 57.55 (CH<sub>3</sub>), 44.80 (C5').

<sup>15</sup>N-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 248.60 (N7), 168.35 (N9), 148.03 (N1), 74.32 (NH<sub>2</sub>).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый вариант синтеза ARCA гуанозинового типа, метилированного по N7 и 3'-положениям гуанозина. Реализована схема конденсации 5'-монофосфата 7,3'-*O*-диметилгуанозина и 5'-дифосфата гуанозина, причем проводили активацию имидазолом именно 5'-дифосфата гуанозина. Определены условия фосфорилирования 3'-*O*-метилгуанозина, позволяющие избежать образования побочного 3'-*O*-метил-5'-дезоксид-5'-хлоргуанозин-2'-фосфата. ARCA синтезирован с высоким выходом (89% на стадии конденсации).

Разработанный вариант синтеза ARCA легко масштабируется и может быть использован в практике

биоорганической химии для получения граммовых количеств ARCA.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Соглашения 075-15-2021-1049.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peng Z.-H., Sharma V., Scott F. Singleton S.F., Paul D. Gershon P.D. // *Org. Lett.* 2002. V. 4. P. 161–164. <https://doi.org/10.1021/ol0167715>
2. Ryzdzik A.M., Lukaszewicz M., Zuberek J., Kowalska J., Darzynkiewicz Z.M., Darzynkiewicz E., Jemielity J. // *Org. Biomol. Chem.* 2009. V. 7. P. 4763–4776. <https://doi.org/10.1039/B911347A>
3. Grudzien-Nogalska E., Stepinski J., Jemielity J., Zuberek J., Stolarski R., Rhoads R.E., Darzynkiewicz E. // *Methods Enzymol.* 2007. V. 431. P. 203–227. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)31011-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)31011-2)
4. Stepinski J., Waddell C., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E. // *RNA.* 2001. V. 7. P. 1486–1495.
5. Jemielity J., Fowler T., Zuberek J., Stepinski J., Lewdorowicz M., Niedzwiecka A., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E. // *RNA.* 2003. V. 9. P. 1108–1122. <https://doi.org/10.1261/rna.5430403>
6. Yoshikawa M., Kato T., Takenishi T. // *Bull. Chem. Soc. Jap.* 1969. V. 42. P. 3505–3508.
7. Kadokura M., Wada T., Urashima C., Sekine M. // *Tetrahedron Lett.* 1997. V. 38. P. 8359–8362. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)10263-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)10263-5)

# A New Approach to the Synthesis of Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) $2^m\text{GpppG}$

A. L. Kayushin<sup>\*,#</sup>, K. V. Antonov<sup>\*</sup>, E. V. Dorofeeva<sup>\*</sup>, M. Ya. Berzina<sup>\*</sup>, A. O. Arnautova<sup>\*</sup>,  
I. A. Prohorenko<sup>\*</sup>, A. I. Miroshnikov<sup>\*</sup>, and I. D. Konstantinova<sup>\*</sup>

<sup>#</sup> Phone: +7(916)-686-45-03; e-mail: kayushin.alexej@yandex.ru

<sup>\*</sup> Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

A new approach to the synthesis of Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) of the classical structure – dimethylated guanosine dinucleotide  $2^m\text{GpppG}$  is proposed. The classical approach to obtaining consists in condensation of activated 5'-diphosphate of 7,3'-*O*-dimethylguanosine with 5'-guanosine monophosphate. We suggest to use a commercially available 3'-*O*-methylguanosine for the synthesis of 5'-monophosphate of dimethylated guanosine only, and to use an activated 5'-guanosine diphosphate in the condensation. The conditions of 3'-*O*-methylguanosine phosphorylation were determined to avoid the formation of a side product 3'-*O*-methyl-5'-deoxy-5'-chloroguanosine-3'-phosphate. ARCA was synthesized with a high yield (89% at the condensation stage). Our approach to the synthesis is easily scaled and can be used for a preparative synthesis of ARCA (several grams).

*Keywords:* ARCA,  $2^m\text{GpppG}$ , imidazolide, guanosine