



УДК 577.213.3 :577.152.277'135

© 1993 А. А. Южаков, З. Г. Чиджавадзе, Р. Ш. Бибилашвили

**СИНТЕЗ 3'-МЕРКАПТО-2',3'-ДИДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИД
-5'-ТРИФОСФАТОВ И ИХ СВОЙСТВА В СИНТЕЗЕ ДНК С
РНК-ЗАВИСИМЫМИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ***Кардиологический научный центр РАМН, Москва*

Синтезированы 3'-меркапто-2', 3'-дидезоксинуклеозиды (Т, G, C и A) и их 5'-трифосфаты. Изучены субстратные свойства аналогов нуклеотидов в бесклеточных системах с ДНК-полимеразой α из тимуса телят, ДНК-полимеразой I из *E. coli* (фрагмент Кленова), концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (из тимуса телят) и обратными транскриптазами вирусов AMV, HIV и MLV. Показано, что данные соединения селективно и необратимо терминируют элонгацию ДНК обратными транскриптазами AMV и HIV, а также концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазой. Для других ДНК-полимераз и обратной транскриптазы MLV 3'-меркапто-2', 3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфаты субстратных свойств не проявили. С помощью реакции Элмана с продуктами ферментативного синтеза в присутствии dNTP(3'SH) показано, что монофосфатный остаток аналога нуклеотида включается в полинуклеотидную цепь на 3'-конец и 3'-меркаптогруппа сохраняет свою реакционную способность.

Ранее нами было показано, что dTTP(3'SH) — селективный и необратимый терминатор биосинтеза ДНК для обратных транскриптаз AMV и HIV, а нуклеозид dThd(3'SH) проявил на лимфобластоидной культуре клеток с вирусом HIV-1 такую же высокую антивирусную активность, как и 3'-азидо-3'-дезокситимидин [1]. В данной работе мы представляем синтез всех четырех dNTP(3'SH) и описываем проверку их терминаторных свойств с ДНК-полимеразами α (из тимуса телят), ДНК-полимеразой I из *E. coli* (фрагмент Кленова), концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазой, обратными транскриптазами MLV, AMV и HIV.

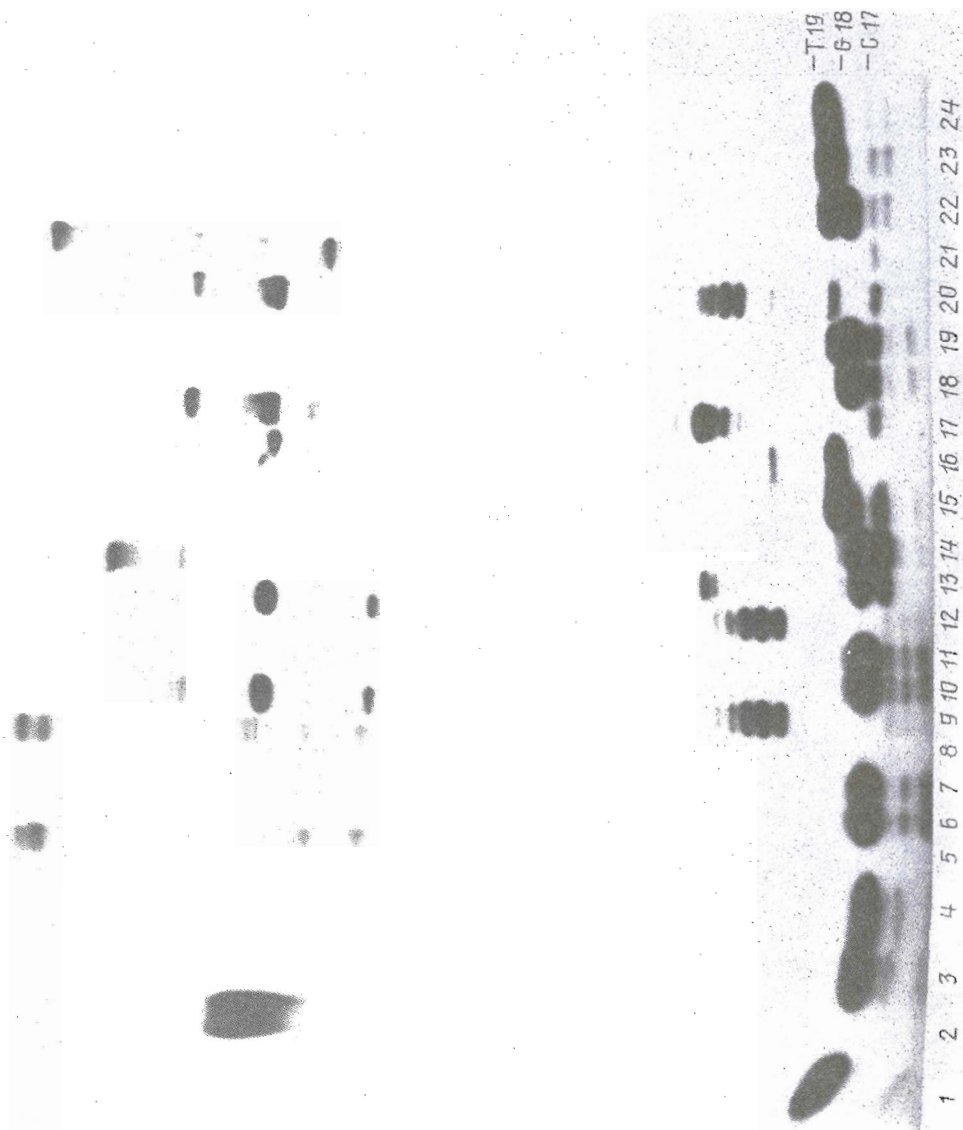
В работе [1] мы описывали синтез Thd(3'SH) из 2,3'-O-ангидротимидина (выход 42%) и несколько позже [2] сообщали о новом подходе к его получению по методикам [3] и [4]. Новый метод основан на двойном обращении около 3'-атома дезоксирибозы. На первой стадии 5'-монометокситрилитимидин (I) обрабатывали метансульфонилхлоридом, и полученный 5'-O-монометокситрилитил-3'-O-метансульфонилтимидин (II) после щелочной обработки давал 5'-O-монометокситрилитил-2'-дезоксидеокси-кисило-тимидин (III), который вторично метансульфонилируется по 3'-положению. Полученный 5'-O-монометокситрилитил-2'-дезоксидеокси-3'-O-метансульфонил-кисило-тимидин (IV) выдерживается в 10-кратном растворе Na-соли тиобензойной кислоты в DMF в течение 72 ч при 60°С. При этих условиях реакция протекает полностью, без продуктов осмоления и после удаления монометокситрилитильной группы приводила к 3'-дезоксидеокси-3'-тиобензоилтимидину (V) с выходом более 90%.

Сокращения: dNTP(3'SH) — 5'-трифосфаты соответствующих 3'-меркапто-2', 3'-дидезоксинуклеозидов; HIV — вирус иммунодефицита человека; AMV — вирус миелобластога птиц; MLV — вирус лейкоза мышей Молони; Pal — пальмитоил.

Химические сдвиги (σ , м. д.) и константы спин-спинового взаимодействия (J , Гц) протонов в $^1\text{H-NMR}$ -спектрах синтезированных нуклеозидов

Соединение	H-6 ($J_{5,6}$)	H-5 или H-8	H-1' (J_1' , 2'а) (J_1' , 2'б)	H-2' (J_2' , 3')	H-3' (J_3' , 4')	H-4' (J_4' , 5'а, б)	H-5' а, б	Прочие
	H-8		H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5' а, б	
VI	7,90д (1,0)	H-2	6,16дд (4,6; 6,7)	2,55—2,50м	3,67м	4,01м	3,94—3,82м	1,86д(5-CH ₃ , J 1,0)
VII	7,78д (7,8)	5,73д	6,18дд (5,2; 6,4)	2,40—2,32м	3,48м	3,92дд (4,0; 4,5)	3,80м	5,14т(-OH, $J_{5a,б}$ 4,8 ; 4,8) 7,18д(NH ₂)
X	7,80д (7,6)	5,75д	6,40дд (3,8; 2,5)	2,68—2,64м		4,02—3,51м		5,10т(-OH, $J_{5a,б}$ 4,85 ; 4,86) 7,20д(NH ₂)
XI	8,2с	8,0с	6,24дд (4,8; 6,8)	3,02—2,92м		3,78—3,59м		5,0т(-OH, $J_{5a,б}$ 5,5) 7,32уc(NH ₂)
XIV	8,08с	8,1с	6,54дд (3,8; 2,0)	3,11—3,05м		4,00—3,79м		5,05т(-OH, $J_{5a,б}$ 5,5) 7,32уc(NH ₂)
XV	7,94с	—	6,18дд (4,9; 6,7)	2,80—2,61м		4,04—3,60м		5,05т(-OH, $J_{5a,б}$ 5,5) 6,5уc(NH ₂)
XVIII	7,70с	—	6,38дд (3,9; 3,0)	3,02—2,94м		4,15—3,80м		5,10т(-OH, $J_{5a,б}$ 5,5) 6,48уc(NH ₂)

Рис. 1. Электрофорограмма продуктов синтеза ДНК с дезоксирибонуклеотидилтрансферазой I (треки 2—4), ДНК-полимеразой I (фрагмент Клевона) (5—8), ДНК-полимеразой α (9—12), обратными транскриптазами AMV (13—16), MLV (17—20), HIV (21—24). Синтез проводили в присутствии 20 мкМ TTP (2), 200 мкМ TTP(3'SH) (3), при добавлении TTP (реакция «угона») (4), в присутствии суммы dNTP (25 мкмоль/л каждого) (5, 9, 13, 17, 21), в присутствии 10 мкМ dGTP (6, 10, 14, 18, 22), 10 мкМ GTP и 200 мкМ TTP(3'SH) (7, 11, 15, 19, 23), в тех же условиях, но с последующей реакцией «угона» (8, 12, 16, 20, 24)



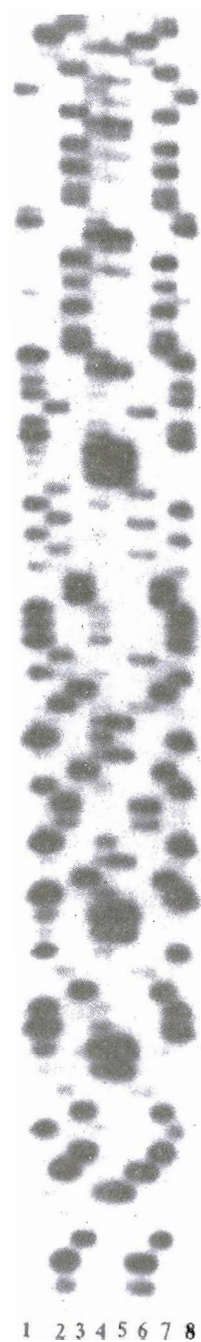


Рис. 2. Электрофореграмма сиквенса ДНК обратной транскриптазой HIV в присутствии смеси природных dNTP (по 50 мкмоль/л) и по 1 мкмоль/л дидезоксинуклеозидтрифосфатов: ddGTP (трек 1), ddCTP (2), ddTTP (3), ddATP (4), dATP(3'SH) (5), dGTP(3'SH) (6), dCTP(3'SH) (7) и dTTP(3'SH) (8)

Обратная транскриптаза MLV практически не использует dTTP(3'SH) в качестве субстрата (очень слабая полоса T19 в треках 19 и 20). Наиболее высокую активность dTTP(3'SH) проявил для обратной транскриптазы HIV. Полоса G18 (трек 22) практически полностью переходит в полосу T19 (трек 23), не оставляя материала для реакции угона (трек 24). Все случаи терминации были необратимы. Кроме того, мы не увидели каких-либо субстратных различий между dNTP(3'SH) в зависимости от основания. Этот факт иллюстрируется на примере терминации синтеза ДНК обратной транскриптазой HIV в стандартной реакции по определению первичной структуры, результаты которой показаны на рис. 2.

Хотя приведенные выше результаты убедительно свидетельствуют о том, что dNTP(3'SH) служат терминирующими субстратами для обратной транскриптазы HIV и концевой трансферазы, мы предприняли попытку показать, что терминированные этими аналогами продукты реакции содержат меркаптогруппу на 3'-конце. Для этого 5'-меченный ^{32}P продукт реакции концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы с dTTP(3'SH) был выделен ВЭЖХ на аналитической колонке Nucleosil-C18, упарен и после обработки реактивом Элмана повторно нанесен на ту же колонку. Время удерживания терминированного продукта при этом составило 19,5 против 16 мин до обработки. В качестве контроля использовался исходный олигонуклеотид, а также продукт реакции, полученный в тех же условиях с 3'-дезокситимидин-5'-трифосфатом. Обработка реактивом Элмана не привела к изменению времени удерживания (16 мин) у контрольных образцов. То же самое было сделано и для продукта, полученного обратной транскриптазой HIV с dATP(3'SH). При этом время удерживания изменилось с 16,5 на 18,5 мин, тогда как у контрольного продукта, полученного при реакции с 2', 3'-дидезоксиаденозин-5'-трифосфатом после обработки реактивом Элмана, оно осталось прежним (16,5 мин).

Заключение. Разработан новый метод синтеза 3'-меркапто-2', 3'-дидезоксинуклеозидов и соответствующих нуклеотидов. Показано, что соответствующие 5'-трифосфаты служат терминирующими рост цепи ДНК субстратами для ДНК обратных транскриптаз и концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы и не терминируют синтез ДНК другими, исследованными в данной работе, полимеразы. Показано, что продукты ферментативного синтеза сохраняют реакционноспособную свободную меркаптогруппу на 3'-конце терминированного продукта реакции, т. е. аналог нуклеотида включается в 3'-конец продукта. Концевая меркаптогруппа может быть использована для специфического введения репортерных групп, что может послужить основой для разработки альтернативного метода определения первичной структуры ДНК без использования радиоактивности. Показано, что обратная транскриптаза HIV значительно лучше использует 3'-меркаптопроизводные dNTP по сравнению с другими исследованными обратными транскриптазами, что позволяет надеяться, что данные аналоги нуклеозидов могут оказаться основой для создания препарата для лечения СПИД.

Экспериментальная часть

ТСХ проводили на стандартных пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ), препаративную ТСХ — на пластинках PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ с толщиной слоя 2 мм (Merck, ФРГ). Системы: хлороформ — метанол, 9 : 1 (А); этилацетат (двукратное элюирование) (Б). Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Silpearl (Chemapol, ЧСФР), ВЭЖХ — на колонках Nucleosil-C18 (Alltech, США) размером 15 см×4,6 мм (размер частиц 5 мкм, скорость элюции во всех случаях 1 мл/мин), препаративную ВЭЖХ — на колонке Whatman Partisil 10 ODS-3 (20 мм×50 см; скорость элюции 5,5 мл/мин; жидкостный хроматограф фирмы Gilson, Франция).

Для анализа нуклеозидов, олигонуклеотидов, а также продуктов реакций синтеза ДНК до и после обработки реактивом Элмана промывали колонку

Nucleosil-C18 водой в течение 5 мин и затем элюировали соединения ацетонитрилом в воде (линейный градиент 0 — 60% ацетонитрила в воде за 40 мин). Для препаративного разделения нуклеозидов на колонке Partisil 10 ODS-3 колонку 10 мин промывали 4% ацетонитрилом в воде, а затем линейным градиентом 4 — 60% ацетонитрила в воде за 360 мин.

Поглощение элюатов детектировали при 264 нм с помощью проточного спектрофотометра Кнауер (ФРГ).

УФ-спектры снимали в метаноле и воде на спектрофотометре Yanako UO-200 (Япония), ¹H-ЯМР-спектры — на спектрометре WM-500 (Bruker, ФРГ) в CD₃OD, CDCl₃ или DMSO-*d*₆ с тетраметилсилианом в качестве внутреннего стандарта (значения даны в м. д., КССВ (J) — в Гц; условные обозначения: с — синглет, д — дублет, дд — дублет дублетов, т — триплет, к — квартет, ус — уширенный синглет). Элементный анализ проводили на CHNOS-1106 Carlo-Erba (Италия).

5'-О-Монометокситритилтимидин (I). Растворяли 3,5 г (14,2 ммоль) тимидина в 50 мл сухого пиридина и прибавляли 5 г (15,6 ммоль) монометокситритилхлорида. Раствор перемешивали 4 ч при 20° С и упаривали. Остаток наносили на колонку (5×25 см) с силикагелем. Элюировали последовательно хлороформом, 1% метанолом в хлороформе, 2% метанолом в хлороформе (по 1 л). Фракции, содержащие нуклеозид (I), упаривали. *R_f*, 0,78 (A). Выход 7 г (12,8 ммоль) — 90%.

3'-О-Метансульфонил-5'-О-монометокситритилтимидин (II). К раствору 7 г (12,8 ммоль) нуклеозида (I) в 50 мл пиридина при 0° С при перемешивании добавляли 10 мл (13 ммоль) метансульфонилхлорида. Реакционную смесь оставляли при 20° С на 10 ч, добавляли 5 мл метанола, выдерживали еще 1 ч и выливали в 5 л холодной воды со льдом. Осадок отделяли, промывали холодной водой и сушили. *R_f*, 0,82 (A). Выход 7,2 г (93,7%).

5'-О-Монометокситритил-2'-дезоксисило-тимидин (III). Нагревали до кипения раствор 7,2 г (12 ммоль) соединения (II) в 100 мл 80% этанола, добавляли 20 мл 2 М NaOH и кипятили еще 30—40 мин. Растворитель упаривали, добавляли 100 мл 0,1 М NaCl и 200 мл хлороформа, смесь встряхивали, органическую фазу отделяли, промывали 0,1 М NaCl (3×200 мл), сушили Na₂SO₄ и упаривали. *R_f*, 0,76 (A). Выход 5,67 г (90%).

5'-О-Монометокситритил-2'-дезоксисило-3'-О-метансульфонил-кисило-тимидин (IV) получали из кислопроизводного (III) по описанной выше методике для соединения (II). *R_f*, 0,7 (A). Выход 5,86 г (90%).

3'-Тиобензоил-3'-дезокситимидин (V). К раствору 5,86 г (9,72 ммоль) мезилата (IV) в 200 мл DMF добавляли 16 г (100 ммоль) натриевой соли тиобензойной кислоты и перемешивали при 60° С в течение 72 ч, контролируя ход реакции по ТСХ. Растворитель упаривали в вакууме, остаток растворяли в 200 мл хлороформа и промывали водой (3×300 мл), органическую фазу высушивали сульфатом натрия, упаривали и растворяли в 100 мл 2% раствора дихлоруксусной кислоты в дихлорметане, перемешивали 1 ч и упаривали. Остаток растворяли в 200 мл хлороформа, промывали 2% раствором бикарбоната натрия в 0,1 М NaCl, сушили над сульфатом натрия, наносили на колонку с силикагелем (10×15 см) и элюировали в системе хлороформ — метанол в линейном градиенте 0—10% (3 л). *R_f*, 0,65 (A). Время удерживания на колонке Partisil 10 ODS-3 составило 183,1 мин. Выход 3,5 г (94%). Найдено, % С 56,70; Н 5,41; N 7,69; S 8,63. C₁₇H₁₈N₂O₅S. Вычислено, %: С 56,33; Н 5,02; N 7,73; S 8,85.

3'-Меркапто-3'-дезокситимидин (VI). 2 мг (5,5 мкмоль) нуклеозида (V) заливали 3 мкл 8% раствора аммиака в метаноле. Раствор выдерживали при перемешивании 20 мин и упаривали. Остаток растворяли в 100 мкл 60% метанола и наносили на колонку Nucleosil-C18. Время удерживания составило 29,77 мин. Выход 1,34 мг (94,5%). Хроматографические и спектральные характеристики нуклеозида (VI) полностью совпали с 3'-меркапто-3'-дезокситимидином, полу-

ченным ранее [1]. R_f 0,45 (A). Найдено, %: С 46,57; Н 5,53; N 10,69; S 12,40. $C_{10}H_{14}N_2O_4S$. Вычислено, %: С 46,50; Н 5,48; N 10,85; S 12,42. УФ-спектр (метанол): λ_{\max} 265 нм (ϵ 9200).

3'-Меркапто-2', 3'-дидезоксицитидин (VII). Суспензию N^4 -бензоилцитозина (5,93 г, 27,6 ммоль) в смеси 90 мл гексаметилдисилазана и 5 мл триметилхлорсилана кипятили 5 ч, добавляя через 1 и 4 ч по 4 мл триметилхлорсилана. Гомогенную смесь упаривали досуха. Остаток растворяли в 25 мл безводного ацетонитрила, добавляли к раствору 1 г (2,76 ммоль) нуклеозида (V) и 0,72 мл (0,88 г, 4 ммоль) $Me_3SiOSO_2CF_3$, реакционную смесь кипятили без доступа влаги 3 ч, охлаждали до 20° С и выливали в смесь 5% бикарбоната натрия и хлороформа (1 : 1 по объему, 250 мл). Органический слой отделяли, водный слой промывали хлороформом (2×50 мл), хлороформные экстракты объединяли, высушивали над сульфатом натрия, упаривали и наносили на колонку (5×25 см) с силикагелем. Продукты реакции элюировали хлороформом (500 мл), а затем линейным градиентом метанола в хлороформе (0—5%, 2,5 л). В порядке выхода с колонки получили смесь 1-(2, 3-дидезокси-3-тиобензоил- α -*D*-рибофуранозил)- N^4 -бензоилцитозина (VIII), R_f 0,73 (A), и 1-(2, 3-дидезокси-3-тиобензоил- β -*D*-рибофуранозил)- N^4 -бензоилцитозина (IX), R_f 0,70 (A), исходный нуклеозид (V), R_f 0,65 (A). Полученную смесь аномеров упаривали досуха, растворяли в 15 мл 50% ацетонитрила в воде и наносили на препаративную колонку ВЭЖХ. В порядке выхода с колонки получили β -аномер (IX) с временем удерживания 141,3 мин и α -аномер (VIII) с временем удерживания 150,4 мин. Фракции упаривали. Выход изомера (IX): 0,2 г (17%). Найдено, %: С 63,68; Н 4,89; N 9,10; S 7,62. $C_{23}H_{21}N_3O_3S$. Вычислено, %: С 63,42; Н 4,87; N 9,65; S 7,06. Выход изомера (VIII): 0,118 г (10%). Отбирали по 2 мг образцов веществ (VIII) и (IX), добавляя к каждому по 200 мкл 8% аммиака в метаноле и оставляли на 24 ч в герметическом сосуде при 20° С. Смеси упаривали, растворяли в 50% метаноле (каждую в 0,1 мл) и разделяли ВЭЖХ на колонке Nucleosil-C18. Время удерживания для 3'-меркапто-3'-дидезоксицитидина (VII) составляло 25,18 мин. Найдено, %: С 44,81; Н 5,22; N 16,92; S 13,11. $C_9H_{13}N_3O_3S$. Вычислено, %: С 44,42; Н 5,40; N 17,27; S 13,18. УФ-спектр (метанол): λ_{\max} 272 (ϵ 6200). Время удерживания для 1-(2,3-дидезокси-3'-меркапто- α -*D*-рибофуранозил)цитозина (X) составило 26,46 мин.

3'-Меркапто-2', 3'-дидезоксиаденозин (XI). Перемешивали суспензию 1,32 г (5,52 ммоль) N^6 -бензоиладенина в смеси гексаметилдисилазана (18 мл) и триметилхлорсилана (1 мл) при кипячении до полного растворения. Кипятили еще 2 ч, добавляя через каждый час по 0,5 мл триметилхлорсилана. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 20 мл сухого ацетонитрила и добавляли 1 г (2,76 ммоль) нуклеозида (V) и 0,72 мл (0,88 г, 4 ммоль) $Me_3SiOSO_2CF_3$. Смесь кипятили 3 ч при перемешивании без доступа влаги, контролируя убывание исходного соединения (V) по ТСХ. Реакционную смесь выливали в охлажденную смесь насыщенного раствора бикарбоната натрия и хлороформа (1 : 1, по объему 200 мл), встряхивали, отделяли органический слой, высушивали над сульфатом натрия, упаривали и наносили на колонку (5×25 см) с силикагелем. Продукты реакции элюировали хлороформом (500 мл), а затем линейным градиентом метанола в хлороформе (0—10%, 3 л). В порядке выхода с колонки получили исходный нуклеозид (V), R_f 0,65 (A), 9-(2,3-дидезокси-3-тиобензоил- α -*D*-рибофуранозил)- N^6 -бензоиладенин (XII), R_f 0,60 (A), и 9-(2,3-дидезокси-3-тиобензоил- β -*D*-рибофуранозил)- N^6 -бензоиладенин (XIII), R_f 0,55 (A). Более полное разделение смеси изомеров (XII) и (XIII) осуществляли препаративной ВЭЖХ. Время удерживания для аномера (XIII) 216,6, а для аномера (XII) 230,2 мин. Выход для вещества (XII) 0,131 г (10%), (XIII) — 0,157 г (12%). Для изомера (XIII) найдено, %: С 60, 73; Н 4,49; N 14,52; S 6,23. $C_{24}H_{21}N_5O_4S$. Вычислено, %: С 60,61; Н 4,46; N 14,73; S 6,74. По 2 мг веществ (XII) и (XIII) после 12 ч

обработки 8% метанольным раствором аммиака наносили на колонку Nucleosil-C18. Для 3'-меркапто-2',3'-дидезоксиаденозина (XI) время удерживания составило 33,03 мин. Найдено, %: С 45,21; Н 5,00; N 26,02; S 11,70. $C_{10}H_{13}N_5O_2S$. Вычислено, %: С 44,92; Н 4,91; N 26,20; S 11,99. УФ-спектр (метанол): λ_{\max} 262 (ε 13 000). Для 9-(2,3-дидезокси-3-меркапто-α-D-рибофуранозил)аденина (XIV) время удерживания 35,02 мин.

3'-Меркапто-2', 3'-дидезоксигуанозин (XV). Суспензию 2,20 г (5,52 ммоль) N²-пальмитоилгуанина в смеси триметилхлорсилана (2,346 мл) и гексаметилди-силазана (17,5 мл) кипятили 5 ч при перемешивании, добавляли через 1 и 4 ч по 1 мл триметилхлорсилана. Реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, добавляли 1 г (2,76 ммоль) нуклеозида (V), 15 мл ацетонитрила и 0,65 мл (0,79 г, 3,58 ммоль) $Me_3SiOSO_2CF_3$, после чего кипятили при перемешивании 3 ч без доступа влаги, контролируя убывание исходного нуклеозида (V). По окончании реакции смесь выливали в насыщенный раствор бикарбоната натрия и этилацетат (1 : 1; 150 мл). Органический слой отделяли, водный слой промывали этилацетатом (2×50 мл), органические экстракты объединяли и отфильтровывали выпавший N²-пальмитоилгуанин. Фильтрат упаривали досуха, остаток упаривали с бензолем, растворяли в хлороформе и наносили на колонку (5×25 см) с силикагелем, элюировали хлороформом (500 мл), затем линейным градиентом концентрации метанола в хлороформе (0—10%). В порядке выхода с колонки получали: исходный нуклеозид (V), смесь 9-(2,3-дидезокси-3-тиобензоил-α-D-рибофуранозил)-N²-пальмитоилгуанина (XVI) и 9-(2,3-дидезокси-3-тиобензоил-β-D-рибофуранозил)-N²-пальмитоилгуанина (XVII). Фракции, содержащие вещества (XVI) и (XVII), объединяли и упаривали. Остаток разделяли препаративной ТСХ в системе Б. Вырезали с пластинки зону в диапазоне R_f от 0 до 0,15 и элюировали продукты 10% метанолом в хлороформе. Раствор упаривали, повторно наносили на пластинку препаративной ТСХ и хроматографировали в системе А. Получали две хорошо разрешенные фракции. Фракция с R_f 0,55 (α-аномер (XVI) 0,155 г, выход 9%) и фракция с R_f 0,49 — соединение (XVII), выход 0,208 г (12%). Найдено, %: С 63,71; Н 7,49; N 11,32; S 5,02. $C_{33}H_{46}N_5O_5S$. Вычислено, %: С 63,42; Н 7,43; N 11,21; S 5,13. Образцы соединений (XVI) и (XVII) (по 3 мг) после удаления защитных групп (8% метанольный раствор аммиака, 12 ч, 20° С) наносили на ВЭЖХ-колонку Nucleosil-C18. Время удерживания для 3'-меркапто-2',3'-дидезоксигуанозина (XV) составило 24,12 мин. Найдено, %: С 47,43; Н 4,70; N 24,51; S 11,22; $C_{10}H_{13}N_5O_3S$. Вычислено, %: С 42,39; Н 4,63; N 24,72; S 11,32. УФ-спектр (метанол): λ_{\max} 270 (ε 13 000). Время удерживания для 9-(2,3-дидезокси-3-меркапто-α-D-рибофуранозил)гуанина (XVIII) составило 26,07 мин.

3'-Меркапто-2', 3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфаты (dNTP(3'SH)) синтезировали по модифицированным методам [10, 11]. В 10 мл ацетонитрила перемешивали 0,235 мл $POCl_3$, 0,532 г триазола и 1,08 мл триэтиламина в течение 1 ч при 20° С. Образцы нуклеозидов (V), (IX), (XIII) и (XVII) по 0,276 ммоль трижды переупаривали с сухим пиридином. Фосфорилирующую смесь отфильтровывали, разделяли на четыре равные части и добавляли к нуклеозидным образцам, выдерживали 15 мин и добавляли по 1,15 мл 2 М раствора бис-трибутиламмоний-пирофосфата в DMF и 0,05 мл трибутиламина и оставляли при перемешивании на 1 ч, после чего в каждую смесь добавляли по 25 мл 0,2 М раствора триэтиламмонийбикарбоната в воде. Растворы упаривали, добавляли по 1 мл 8% аммиака в метаноле, оставляли на 12 ч при 20° С и упаривали в вакууме. Полученные остатки растворяли в 10 мл воды (каждый), фильтровали и хроматографировали на колонке (5×10 см) с DEAE-Toyopearl 650 M в линейном градиенте от 0 до 2 М триэтиламмонийбикарбоната (2 л). Фракции, содержащие 5'-трифосфаты, упаривали в вакууме, снова упаривали с водой (3×1 мл) и высушивали. Выходы для ТТР(3'SH) — 0,149 г (60%), dСТР(3'SH) — 0,11 г (45%), dАТР(3'SH) — 0,120 г (48%), dGТР(3'SH) — 0,102 г (40%). После

Авторы благодарят Экспертную комиссию по направлению «СПИД» за финансирование проекта № 77, прошедшего конкурсный отбор НИР в рамках ГНТП «Борьба с наиболее распространенными болезнями», и Э. В. Чернышову за помощь в подготовке статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Южаков А. А., Чиджавадзе З. Г., Бибилашвили Р. Ш., Краевский А. А., Галегов Г. А., Носик Д. Н., Килессо Т. Ю.//Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 4. С. 504—509.
2. Yuzhakov A., Chidgeavadze Z., Beabealashvili R.//Nucl. Acids Res. Symposium Series. 1991. № 24. P. 266.
3. Herderwijn P., Balzarini J., Baba M., Pauwels R., Van Aerschot A., Janssen G., De Clercq E.//J. Med. Chem. 1988. V. 31. № 9. P. 2040—2048.
4. Cosstick R., Vyle J. S.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 4. P. 829—835.
5. Imarova M., Eckstein F.//J. Org. Chem. 1978. V. 43. № 15. P. 3044—3047.
6. Visser G. M., Keckmink R., Schattenkerk C., Kraal B., Van Boom J.//Nucleosides and Nucleotides. 1984. V. 3. № 3. P. 277—286.
7. Vinogradov S. V., Titeeva G. R., Berlin Yu. A.//Nucl. Acids Res. Symposium Series. 1984. № 14. P. 271—272.
8. Ellman G. L.//Arch. Biochem. and Biophys. 1959. V. 82. № 10. P. 70.
9. King T. P., Li I. J., Kochouman E. V.//Biochemistry. 1978. V. 17. № 8. P. 1499—1505.
10. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M.//J. Chromatogr. 1975. V. 114. № 5. P. 129—141.
11. Grosse F., Krauss G.//Biochemistry. 1981. V. 20. № 19. P. 5470—5475.
12. Bollum F. J., Chang L. M. S., Triapolis C. H., Dorson J. W.//Methods Enzymol. 1974. V. 24. P. 347—395.
13. Houts G. E., Miyagi M., Ellis C., Beard J. W.//J. Virol. 1979. V. 29. № 2. P. 517—523.
14. Houts G. E., Miyagi M., Ellis C., Beard A., Beard J. W.//J. Virol. 1979. V. 29. № 1. P. 271—276.
15. De Vico A. L., Copeland T. D., di Marzo Veronez F., Oroszlan S., Galla R. C., Saragadharan M. S.//AIDS Res. and Human Retroviruses. 1989. V. 5. № 1. P. 51—60.
16. Cameron V., Uhlenbeck O. C.//Biochemistry. 1977. V. 16. № 23. P. 5120—5126.
17. Laemmli U. K.//Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.

Поступила в редакцию
1.VII.1992

A. A. Yuzhakov, Z. G. Chidgeavadze, R. Sh. Beabealashvili

SYNTHESIS OF 3'-MERCAPTO-2', 3'- DIDEOXYNUCLEOTIDES AND THEIR PROPERTIES IN THE DNA SYNTHESIS BY RNA-DEPENDENT DNA POLYMERASES

Cardiology Research Centre, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

3'-Mercapto-2',3'-dideoxy-NTP were synthesized and tested as DNA chain terminating nucleotides. It is shown that the analogues selectively and irreversibly terminate DNA chain elongation by AMV and HIV reverse transcriptases and terminal deoxynucleotidyl transferase, whereas calf thymus alpha DNA polymerase, *E. coli* DNA polymerase I (Klenow fragment) and MLV reverse transcriptase do not use the nucleotide analogues as chain terminator substrates.