



СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА ДИОКСОЛАНОВЫХ АНАЛОГОВ 3'-ДЕЗОКСИТИМИДИН-5'-ТРИФОСФАТА В РЕАКЦИЯХ СИНТЕЗА ДНК, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ

© 1995 г. Е. В. Ефимцева, С. Н. Михайлов[#], Л. С. Викторова,
Т. А. Розовская*, Р. Ш. Бибилашвили*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 117984, Москва В-334, ул. Вавилова, д. 32;

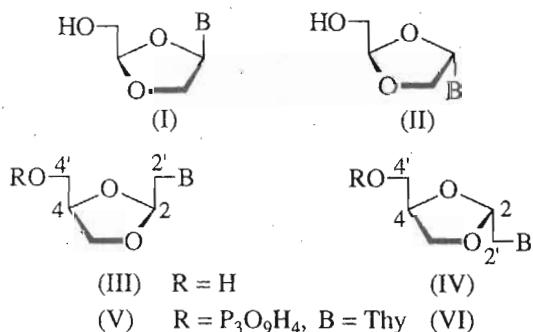
* Институт экспериментальной кардиологии Кардиологического научного центра РАМН, Москва

Поступила в редакцию 26.12.94 г.

Исследованы субстратные свойства аналогов 3'-дезокситимидин-5'-трифосфата на основе 2,4-дизамещенных 1,3-диоксоланов в реакциях синтеза ДНК, катализируемых различными ДНК-полимеразами. Показано, что 4'-трифосфаты (\pm)-*цикло*-4-гидроксиметил-2-(тимин-1-илметил)-1,3-диоксолана и соответствующего (\pm)-*транс*-изомера являются термирующими субстратами концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы. Также оказалось, что 4'-трифосфат (\pm)-*цикло*-4-гидроксиметил-2-(тимин-1-илметил)-1,3-диоксолана терминирует синтез ДНК, катализируемый обратной транскриптазой ВИЧ, а 2'-трифосфат (\pm)-*цикло*-2-гидроксиметил-4-(тимин-1-илметил)-1,3-диоксолана является терминатором в синтезе ДНК, катализируемом обратной транскриптазой ВИЧ и фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I.

Ключевые слова: аналоги 3'-дезокситимидин-5'-трифосфата, ДНК-полимеразы, обратная транскриптаза.

В последние годы было показано, что аналоги 2',3'-дизамещенных нуклеозидов, содержащие вместо фуранозного цикла диоксолановый (I) и (II), являются ингибиторами репликации ВИЧ [1 - 3]. Нами были получены родственные соединения на основе (\pm)-*цикло*- и *транс*-4-гидроксиметил-2-метил-1,3-диоксолана (III) и (IV), имеющие конфигурацию, подобную как β -, так и α -нуклеозидам [4, 5]. От ранее описанных аналогов нуклеозидов они отличаются наличием дополнительной CH_2 -группы между гетероциклическим основанием и диоксолановым фрагментом.



Использованные обозначения: ddTTP – 3'-дезокситимидин-5'-трифосфат, ddTTP(3'F) – 3'-фтор-3'-дезокситимидин-5'-трифосфат, ddTTP(3'NH₂) – 3'-амино-3'-дезокситимидин-5'-трифосфат, ВИЧ – вирус иммунодефицита человека.

[#] Автор для переписки.

Настоящая работа посвящена синтезу аналогов 2',3'-дизамещенных нуклеозидов (X), (XI) на основе (\pm)-*цикло*- и (\pm)-*транс*-2-гидроксиметил-4-метил-1,3-диоксолана и изучению субстратных свойств трифосфатов (V), (VI) (B = Thy) [4] и (XV) в реакциях синтеза ДНК, катализируемых ДНК-полимеразами из различных источников.

Получение аналогов нуклеозидов на основе 2-гидроксиметил-4-метил-1,3-диоксолана представлено на схеме 1. Бензоилоксиацитальдегид (VII) получали периодатным окислением 1-бензоилглицерина [6]. Реакция альдегида (VII) с 1-О-тозилглицерином (VIII) [7] в присутствии катионообменной смолы (H^+ -форма) приводила к ацеталю (IX) в виде рацемической смеси диастереомеров с общим выходом 57%. По данным ¹Н-ЯМР-спектров, соотношение *цикло*-/*транс*-изомеров оказалось близким к 1 : 1.

Алкилирование натриевой соли тимина тозилатом (IX) приводило к образованию смеси N1,N3-бис- и N1-замещенных производных тимина, которые разделяли с помощью адсорбционной хроматографии на силикагеле [4]. Наибольшие трудности были связаны с разделением диастереомерных (\pm)-бензоильных производных (X) и (XI). Препаративную обращенно-фазовую хроматографию проводили на колонке, заполненной сорбентом Bondesil C18 в системе ацетонитрил–вода, 1 : 4.

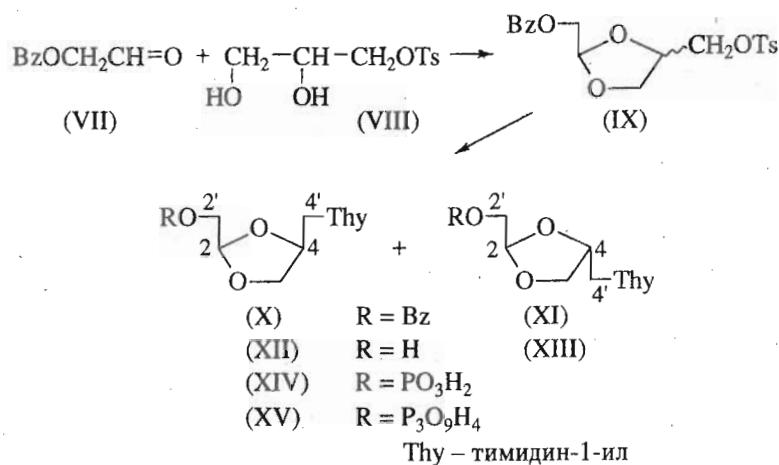


Схема 1.

При этом выделяли смешанную фракцию, которую затем повторно хроматографировали в тех же условиях. В результате выход *цис*- и *транс*-изомеров (X) и (XI) оказался невысоким. Дебензоилирование соединений (X), (XI) аммиаком в метаноле и последующая кристаллизация из этанола приводили к аналогам нуклеозидов (XII) и (XIII). УФ-спектры последних соответствовали спектрам природных N1-тиминовых нуклеозидов. Препараторное разделение *цис*- и *транс*-изомеров возможно только в случае О-бензоильных производных, поскольку времена удерживания незащищенных нуклеозидов (XII) и (XIII) на сорбенте C18 практически одинаковы.

Структуру синтезированных соединений доказывали с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии. Однозначное определение конфигурации диастереомеров (X) и (XI) проведено с использованием метода разностной спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера [5]. Структура нуклеозидов (III), (IV) и (XII) была подтверждена также рентгеноструктурным анализом [8].

Тестирование синтезированных диоксолановых аналогов нуклеозидов на клеточных культурах показало, что они не обладают цитотоксичностью и не проявляют активности против ВИЧ и вирусов группы герпеса [9]. Известно, что механизм антивирусного действия 2',3'-дидезоксинуклеозидов связан с их превращением клеточными киназами в соответствующие 5'-трифосфаты, которые, в свою очередь, ингибируют вирусные обратные транскриптазы и ДНК-полимеразы. Отсутствие противовирусной активности и цитотоксичности в случае полученных диоксолановых аналогов нуклеозидов может быть обусловлено двумя причинами: аналоги нуклеозидов не превращаются в клетке в соответствующие 5'-трифосфаты или последние не являются ингибиторами ДНК-полимераз. Для выяснения возможной

причины отсутствия противовирусной активности нами был осуществлен синтез аналогов ddTTP (V) и (XV), а также был получен 4'-трифосфат *транс*-изомера (VI) – аналог α -нуклеозид-5'-трифосфата.

Получение трифосфатов (V) и (VI) было описано ранее [4]. Обработка нуклеозида (XII) избыtkом β -цианэтилфосфата [10] в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида приводила после щелочного удаления защитной группы к монофосфату (XIV). Трифосфат (XV) синтезировали с хорошим выходом по методу [11]. ^1H -ЯМР-спектры моно- и трифосфата (XIV) и (XV) аналогичны спектрам исходных нуклеозидов.

Субстратные свойства аналогов ddTTP (V), (VI) и (XV) изучались в реакциях синтеза ДНК, катализируемых фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I, концевой дезоксинуклеотидилтрансферазой, обратной транскриптазой ВИЧ. Эксперимент проводили следующим образом: к ДНК M13mp10 с [5'- ^{32}P]праймером (последовательность нуклеотидов синтезируемой цепи ДНК представлена на схеме 2, праймер подчеркнут, порядковые номера нуклеотидов приведены начиная с 5'-концевого нуклеотида) добавляли либо исследуемые соединения (V), (VI), (XV) (рис. 1а, 1б, дорожки 11 - 15, 16 - 20, 21 - 25 соответственно), либо dTTP (рис. 1а, 1б, дорожки 3 - 6), либо ddTTP(3'F) [12, 13] (рис. 1а, 1б, дорожки 7 - 10). Катализ реакции проводили обратной транскриптазой ВИЧ (рис. 1а) и фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I (рис. 1б). Как видно из рис. 1а, 1б, соединение (V) является термирующим субстратом в реакции синтеза ДНК, катализируемой обратной транскриптазой ВИЧ, но не является субстратом в реакции синтеза ДНК, катализируемой фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I. Соединение (XV) включается в цепь ДНК и термирует синтез ДНК при катализе этой реакции как обратной транскриптазой ВИЧ, так и фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I.

Первичная структура синтезированного фрагмента ДНК M13mp10

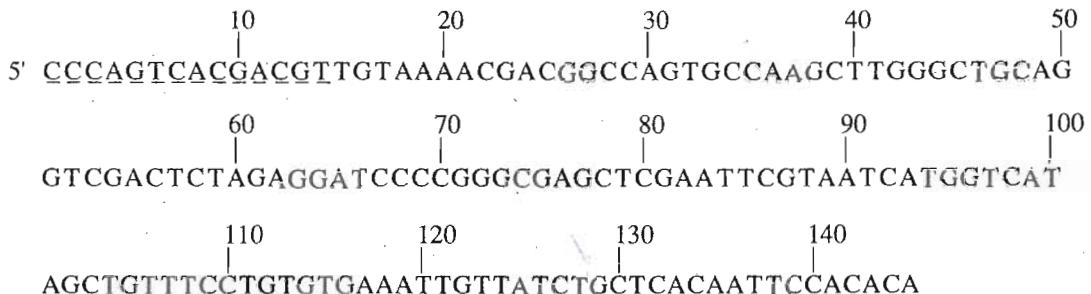


Схема 2.

Аналог (VI) не является субстратом ни для обратной транскриптазы ВИЧ, ни для фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Интересно, что в отличие от dTTP или ddTTP(3'F) (рис. 1б, дорожки 3 - 6, 7 - 10) соединения (V), (VI), (XV) (рис. 1б, дорожки 11 - 15, 16 - 20, 21 - 25) практически не ингибируют 3'-→5'-эксонуклеазную активность фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. На рис. 1а на

контрольных дорожках 3 - 4 в присутствии только одного субстрата dTTP наблюдается удлинение праймера на три нуклеотидных остатка, первым и третьим из которых является dTMP. Это объясняется меньшей точностью обратных транскриптаз по сравнению с другими ДНК-полимеразами, что отмечалось ранее в ряде публикаций [14, 15].

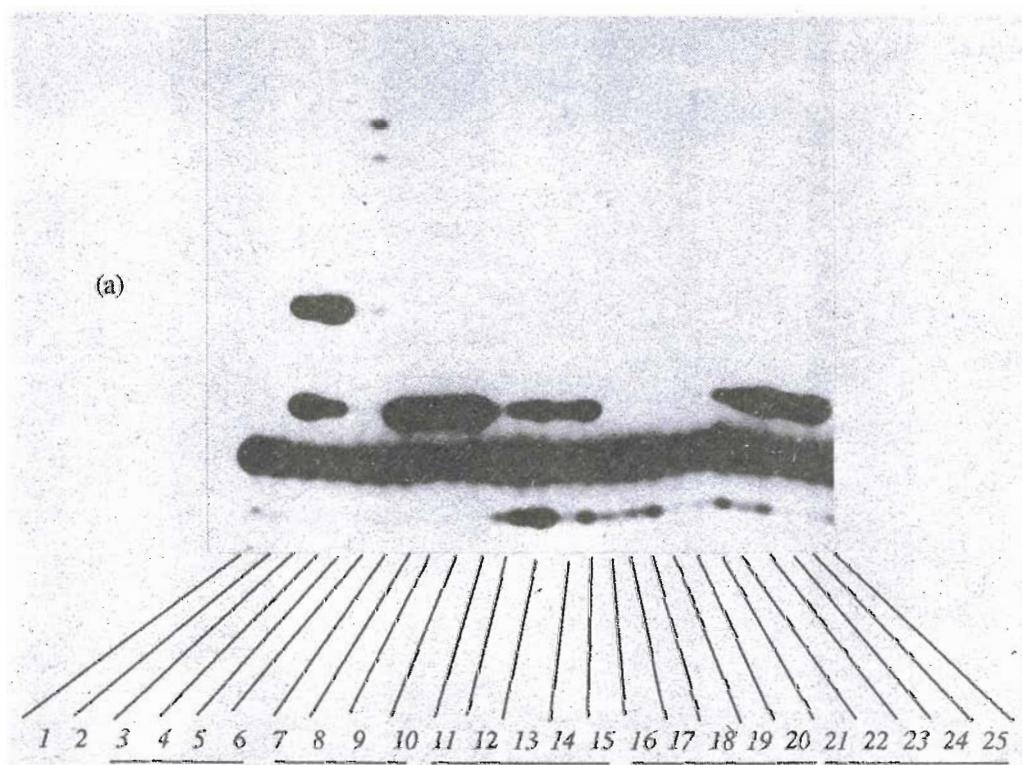


Рис. 1. Авторадиограмма продуктов элонгации [$5'$ - 32 P]олигонуклеотидного праймера обратной транскриптазой ВИЧ (а), фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I (б) и концевой дезоксинуклеотидилтрансферазой (в) в присутствии соединений (V), (VI), (XV). а, б: 1 – комплекс (+)-цепи ДНК M13mp10 с [$5'$ - 32 P]праймером; 2 – инкубация комплекса, показанного на дорожке 1, с соответствующим ферментом; дорожки 3 - 25 – синтез ДНК в присутствии 25 (3, 5), 200 мкМ (4, 6) dTTP; 25 (7, 9) и 200 мкМ (8, 10) ddTTP(3'F); 25 (11), 200 мкМ (12, 14), 1 мМ (13, 15) соединения (V); 25 (16), 200 мкМ (17, 19), 1 мМ (18, 20) соединения (VI); 25 (21), 200 мкМ (22, 24), 1 мМ (23, 25) соединения (XV). Реакции проводили 20 мин при 37°C в случае обратной транскриптазы ВИЧ и при 22°C в случае фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I, дополнительное удлинение фрагментов ДНК (дорожки 5, 6, 9, 10, 14, 15, 19, 20, 24, 25) проводили в присутствии 400 мкМ четырех dNTP в течение 20 мин при тех же температурах; реакции останавливали 50 мМ EDTA.

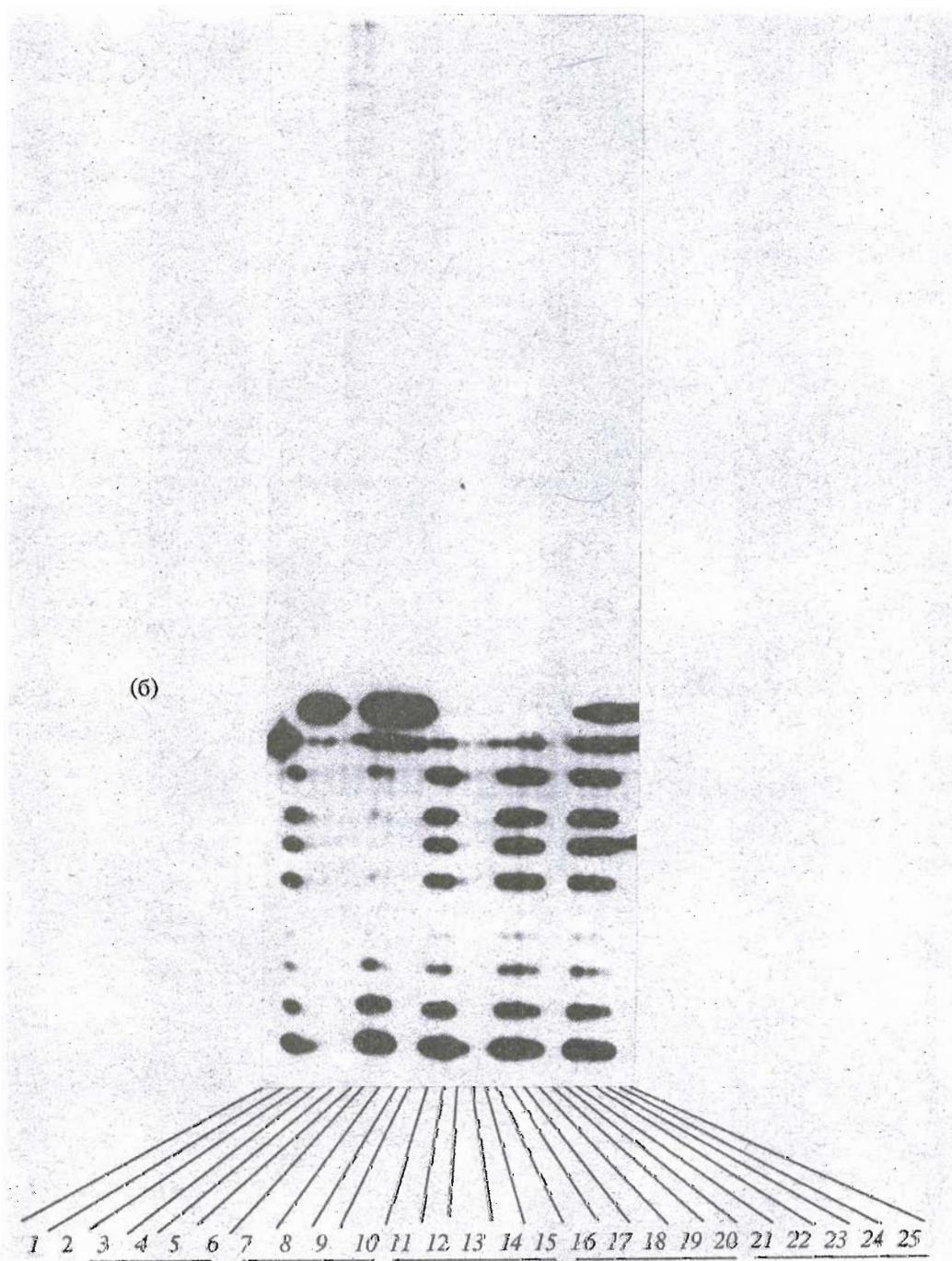


Рис. 16.

Так как в эксперименте с обратной транскриптазой ВИЧ большая доля праймера не участвовала в реакции элонгации, о чем свидетельствует наличие радиоактивного 14-членного олигонуклеотида на всех дорожках (рис. 1а), была проведена дополнительная проверка способности соединений (V), (XV) терминировать синтез ДНК. Для этого исходный [$5'$ - 32 P]праймер (рис. 1а, дорожка 1), [$5'$ - 32 P]праймеры, удлиненные на один нуклеотид и содержащие на 3'-конце либо остаток dTMP (до-

рожки 3, 4), либо ddTMP(3'F) (дорожки 7, 8) и праймеры с присоединенными аналогами (V) (дорожки 12, 13) и (XV) (дорожки 22, 23), вырезали из геля, элюировали, очищали на колонках со смесью DE-52, с фадексом G-15 и после отжига с матрицей вновь использовали в реакциях синтеза ДНК, катализируемых фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I и обратной транскриптазой ВИЧ в присутствии 50 - 500 мкМ четырех природных dNTP. Было показано, что исходный праймер и праймер

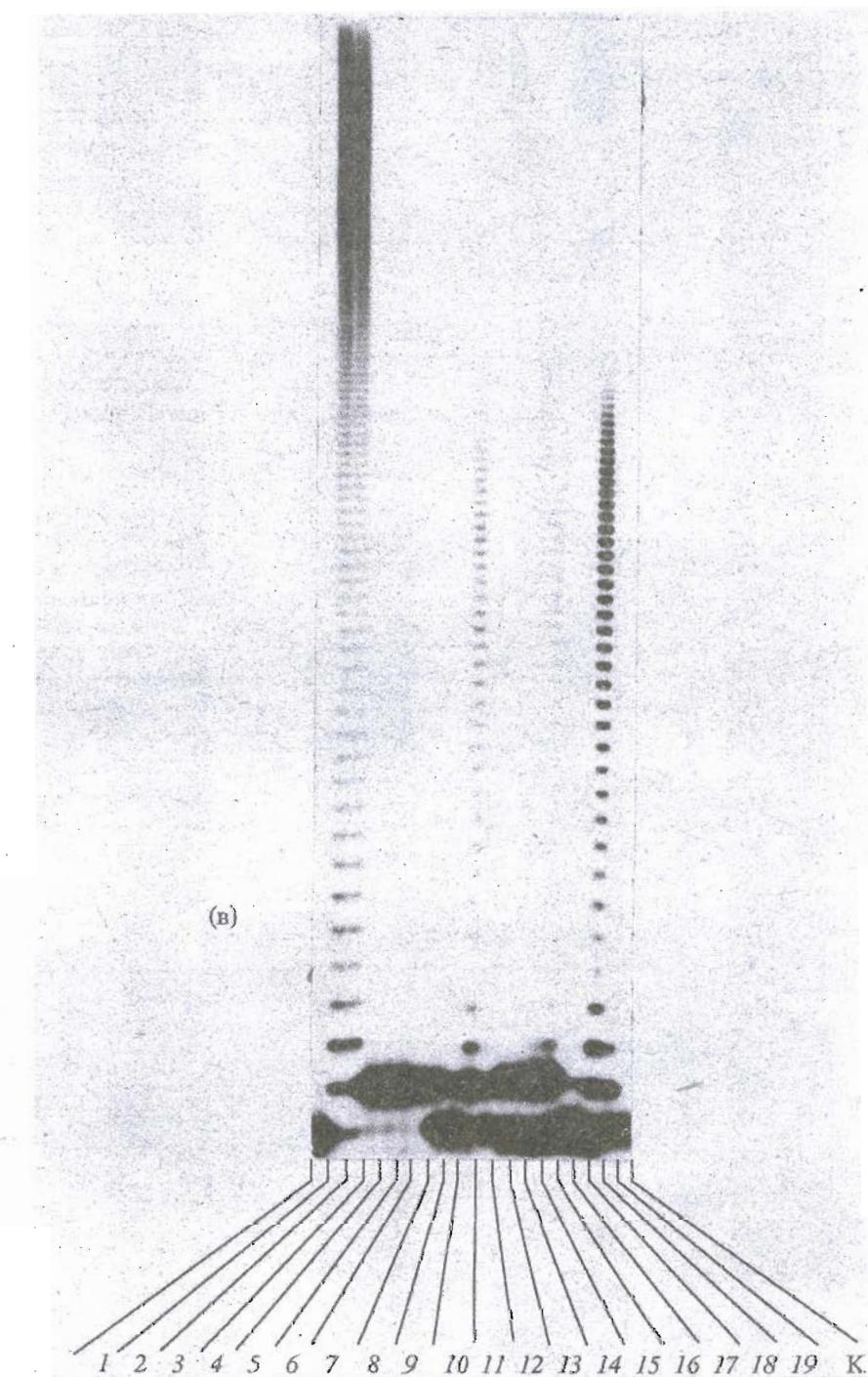


Рис. 1в. К – [$5'$ - 32 P]праймер (контроль), 1 – инкубация праймера (показанного на дорожке К) с концевой дезоксиинуклеотидилтрансферазой; 2 – 19 – синтез ДНК в присутствии 200 мкМ dTTP (2, 3); 200 мкМ ddTTP(3'F) (4 – 7); 200 мкМ (8, 10), 1.5 мМ (9, 11) соединения (V); 200 мкМ (12, 14), 1.5 мМ (13, 15) соединения (VI); 200 мкМ (16, 18), 1.5 мМ (17, 19) соединения (XV). Реакции синтеза ДНК осуществляли в течение 30 мин при 37°C, дополнительное удлинение фрагментов ДНК (дорожки 6, 7, 10, 11, 14, 15, 18, 19) проводили в присутствии 1 мМ dATP в течение 30 мин при той же температуре; реакции останавливали 50 мМ EDTA.

с остатком dTMP на 3'-конце эффективно элонгируется, тогда как остальные праймеры, содержащие на 3'-конце модифицированные нуклеотидные остатки, не способны к элонгации (данные не приведены). Таким образом, проведенный экспе-

римент подтверждает вывод о том, что аналоги (V) и (XV), как и ddTTP(3'F), являются терминаторами синтеза ДНК.

В случае концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы (рис. 1в) удлинение [$5'$ - 32 P]олигонуклеотида

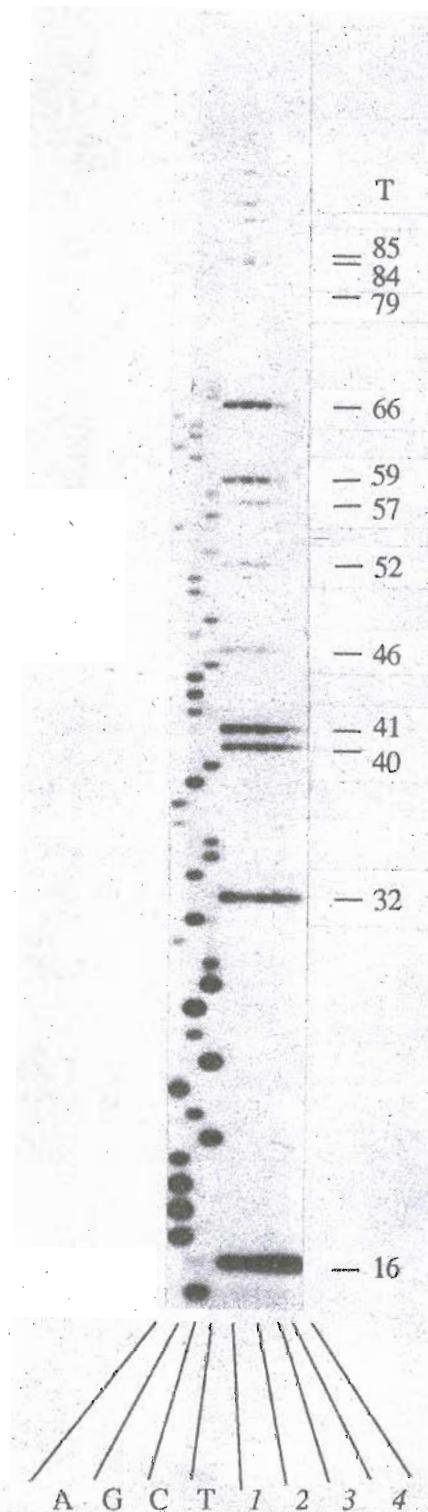


Рис. 2. Электрофореграмма синтезированных обратной транскриптазой ВИЧ фрагментов ДНК M13mp10 в присутствии 1 мМ соединения (V) (1), 1 мМ соединения (XV) (2), 0,4 мкМ ddTTP(3'NH₂) (3), 0,4 мкМ ddTTP (4). А, Г, С и Т – стандартное определение первичной структуры ДНК в присутствии ddNTP с соответствующими основаниями в качестве терминирующих субстратов. Реакции синтеза ДНК проводили 15 мин при 42°C, дополнительное удлинение фрагментов ДНК – в присутствии 250 мкМ dNTP (10 мин, 42°C), реакции останавливали 50 мМ EDTA.

проводили в присутствии либо соединений (V), (VI), (XV) (дорожки 8 - 11, 12 - 15, 16 - 19 соответственно), либо dTTP (дорожки 2, 3), либо ddTTP(3'F) (дорожки 4 - 7). Из сравнения дорожек 2 - 7 с дорожками 8 - 19 (рис. 1в) видно, что соединения (V) и (VI) являются терминирующими субстратами концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы, соединение (XV) субстратом этого фермента не является. Необходимо отметить, что во всех случаях, когда соединения (V), (VI), (XV) являлись терминирующими субстратами в соответствующих реакциях, скорость удлинения исходного [$5'$ -³²P]олигонуклеотида в присутствии этих соединений была существенно ниже скорости удлинения этого же олигонуклеотида в присутствии dTTP или ddTTP(3'F) (на дорожках 2 - 7 отсутствует исходный олигонуклеотид).

Способность соединений (V) и (XV) служить терминирующими субстратами в реакциях синтеза ДНК, катализируемых обратной транскриптазой ВИЧ и фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I, проверяли также в стандартных условиях, когда при определении первичной структуры ДНК соответствующий аналог dNTP вводили в реакционную смесь наряду с одноименным природным dNTP. Результаты этого эксперимента показаны на рис. 2, на котором приведена типичная электрофорограмма реакции синтеза ДНК, катализируемой обратной транскриптазой ВИЧ, в присутствии соединений (V), (XV), ddTTP(3'NH₂) [12, 16, 17] и ddTTP. Видно, что соединения (V) и (XV) терминируют синтез ДНК, катализируемый обратной транскриптазой ВИЧ, включаясь в цепь ДНК вместо остатков тимидиловой кислоты (полосы T16, T32, T40, T41, T46, T52, T57, T59, T66, T79, T84, T85, T88, T91, T94, T97, T100, T104, T106, T107, T108, T111, T113, T115 и др.). Сравнение концентраций терминирующих субстратов, необходимых для получения распределения интенсивностей полос на электрофорограмме, соответствующего первичной структуре ДНК, показало, что относительная эффективность соединений (V) и (XV) как терминаторов синтеза ДНК по меньшей мере на три порядка величины меньше относительной эффективности ddTTP (рис. 2, дорожки 1, 2 и 4 соответственно). Аналогичные результаты были получены при катализе синтеза ДНК фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I (данные не приведены).

Синтезированы диоксолановые гомоаналоги 3'-дезокситимидина с дополнительной CH₂-группой между гетероциклическим основанием и диоксолановым остатком. Полученные аналоги 3'-дезокситимидин-5'-трифосфата (V) и (VI) (как *цикло*-, так и *транс*-производные) являются терминирующими субстратами для концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы, в то же время только *цикло*-изомеры оказались терминирующими субстратами для обратной транскриптазы ВИЧ и

фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Таким образом, отсутствие противовирусной активности и цитотоксичности, по-видимому, связано с тем, что полученные аналоги не превращаются в клетке в соответствующие трифосфаты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker AMX 400 (Германия) при 300 К, значения химических сдвигов (δ , м. д.) рассчитаны относительно сигнала CHCl_3 (δ 7.2 м. д.) для соединений (VIII) - (XI) и относительно сигнала HOD (δ 4.63) для (XII), (XIII), приведены КССВ в герцах. УФ-спектры снимали в воде на приборе Specord UV-VIS (Германия). ТСХ проводили на пластинках с силикагелем Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах: хлороформ (A); хлороформ-этанол, 95 : 5 (B); хлороформ-этанол, 9 : 1 (B'); изо-пропанол-конц. аммиак-вода, 7 : 1 : 2 (Г) и на пластинках с PEI-целлюлозой в системе 1 M LiCl (Д). Сорбентом для препаративной колоночной хроматографии служил силикагель L 40/100 мкм (Chemapol, ЧСФР). Для обращенно-фазовой хроматографии применяли силикагель Bondesil C18 (40 мкм, Analitichem International). Элементный состав соединений (X) - (XIII) отличается от вычисленного не более чем на 0.4% по всем элементам.

2'-Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP), 2',3'-дизезоксинуклеозидтрифосфаты (ddNTP) (Sigma), [α -³²P]dNTP, [γ -³²P]ATP с уд. акт. 1000 - 3000 Кн/ммоль ("Радиоизотоп") дополнительной очистке не подвергались.

Использовали ДНК-полимеразу I, фрагмент Кленова (КФ 2.7.7.7) из *E. coli*, концевую дезокси-нуклеотидилтрансферазу (КФ 2.7.7.31) из тимуса теленка (Amersham), рекомбинантную обратную транскриптазу (КФ 2.7.7.49) ВИЧ [12].

В качестве матрицы для синтеза ДНК использовали одноцепочечную ДНК фага M13mp10 с праймером d(CCCAGTCACGACGT) (схема 2) [12, 18]. Синтез ДНК, катализируемый различными ДНК-полимеразами, проводили в условиях, оптимальных для каждого фермента и описанных в работах [12, 15, 18 - 22]. В отдельных экспериментах использовали 5'-³²P-меченный праймер. Продукты реакции анализировали так, как описано ранее [12, 15, 18 - 22]. Для радиоавтографии использовали рентгеновскую пленку PM-B ("Свема").

Бензоилоксиацетальдегид (VII). К раствору 14.9 г (76 ммоль) 1-О-бензоилглицерина [6] в 60 мл смеси вода-диоксан (1 : 2) добавляли по каплям при перемешивании насыщенный раствор 17.9 г (83.6 ммоль) NaIO_4 в воде и выдерживали 3 ч при 20°C. Осадок фильтровали, промывали диоксаном (3 × 30 мл), фильтрат упаривали в вакууме до небольшого объема (10 мл) и осадок отфильтровывали и промывали диоксаном (3 × 20 мл). Фильтрат

упаривали в вакууме, остаток растворяли в хлороформе (200 мл), промывали водой (3 × 50 мл), органический слой сушили Na_2SO_4 , упаривали в вакууме досуха и сушили над P_2O_5 . Выход 11.3 г (91%) (сироп). R_f 0.83 (B). ¹Н-ЯМР (D_2O): 8.06 - 7.42 м (5H, Bz), 5,37т (1H, J 5.0, CH), 4,30д (2H, CH_2).

(±)-цис/транс-2-Бензоилоксиметил-4-тозилоксиметил-1,3-диоксолан (IX). К раствору 17 г (69 ммоль) 1-О-тозилглицерина (VIII) [7] и 11.3 г (69 ммоль) альдегида (VII) в 100 мл сухого хлороформа добавляли 1.8 мл ионообменной смолы КУ-28 (Н⁺-форма) и смесь кипятили 2 ч с насадкой Дина-Старка. Смолу отфильтровывали, промывали хлороформом, объединенный фильтрат промывали 10% NaHCO_3 (50 мл), водой (2 × 30 мл), сушили Na_2SO_4 и упаривали в вакууме досуха. Из остатка хроматографией на силикагеле в системе А выделяли продукт. Выход 15.25 г (57%) (сироп), R_f 0.34 (A). ¹Н-ЯМР (CDCl_3): 8.04 - 7.19 м (9H, Ts, Bz), 5.25т (0.5H, $J_{2,2a} = J_{2,2b}$ 3.5, транс-H2), 5.17т (0.5H, $J_{2,2a} = J_{2,2b}$ 3.5, цис-H2), 4.43 - 3.85 м (7H, 2H_{2'}, H4, 2H_{4'}, 2H5), 2.41с (3H, Me), соотношение цис/транс-изомеров составило 1 : 1.

(±)-цис-2-Бензоилоксиметил-4-(тимин-1-илметил)-1,3-диоксолан (X) и (±)-транс-2-бензоилоксиметил-4-(тимин-1-илметил)-1,3-диоксолан (XI). К суспензии 1.26 г (10 ммоль) тимина в 30 мл абс. DMF добавляли 0.5 г (12.5 ммоль) 60% NaH, перемешивали 1 ч, нагревали до 110°C и добавляли 3.56 г (9.1 ммоль) тозилата (IX) в 10 мл абс. DMF. Реакционную смесь нагревали 10 ч при 110°C, фильтровали, фильтрат упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в хлороформе (150 мл), органический слой промывали водой (2 × 30 мл), сушили Na_2SO_4 , фильтровали и досуха упаривали. Остаток хроматографировали на силикагеле (200 мл). Колонку промывали системой А, элюируя 2.38 г тозилата (IX), а затем N1,N3-бис-(2-бензоилоксиметил-1,3-диоксолан-4-илметил)тимин с выходом 0.5 г (9%), R_f 0.61 (B). Дальнейшая элюция системой Б приводила к смеси диастереомеров (X) и (XI) в соотношении 1 : 1. Выход 0.5 г (16%), R_f 0.40 (B).

Смесь диастереомеров (0.5 г, 1.45 ммоль) растворяли в 2 мл смеси ацетонитрил-вода (1 : 3), наносили на колонку с сорбентом Bondesil C18 (150 мл). Элюировали системой ацетонитрил-вода (1 : 4). Фракции, содержащие цис-изомер (X), объединяли и упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в хлороформе (50 мл), сушили Na_2SO_4 , фильтровали, упаривали досуха, остаток кристаллизовали из этанола. Получали производное (X), 150 мг (5%). Т. пл. 124.5 - 125°C. ¹Н-ЯМР* (CDCl_3): 8.45 уп. с (1H, NH), 7.03к (1H, $J_{6',5'}$ 1.2, H6"), 5.21т (1H, $J_{2,2a} = J_{2,2b}$ 3.6, H2), 4.43дд (1H,

* Здесь и далее сигналы протонов ядер нового основания отмечены двумя штрихами.

$J_{2a,2b}$ –12.0, H $2'a$), 4.38дд (1H, H $2'b$), 4.36дддд (1H, H 4), 4.05дд (1H, $J_{4a,4}$ 2.7, $J_{4a,4b}$ –14.3, H $4'a$), 4.02дд (1H, $J_{5b,4}$ 6.8, $J_{5a,5b}$ –8.7, H $5b$), 3.78дд (1H, $J_{5a,4}$ 5.6, H $5a$), 3.51дд (1H, $J_{4b,4}$ 7.4, H $4'b$), 1.72д (3H, H $5''$).

Фракции, содержащие *транс*-изомер (XI), объединяли и обрабатывали аналогично. Остаток кристаллизовали из этанола. Выход 100 мг (3%). Т. пл. 121 – 123°C. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 8.52 уш. с (1H, NH), 7.05к (1H, $J_{6'',5'}$ 1.2, H $6''$), 5.35т (1H, $J_{2,2a} = J_{2,2b}$ 3.9, H 2), 4.42дддд (1H, H 4), 4.32дд (1H, $J_{2a,2b}$ –11.9, H $2'a$), 4.28дд (1H, H $2'b$), 4.17дд (1H, $J_{5a,4}$ 6.3, $J_{5a,5b}$ –8.7, H $5a$), 3.96дд (1H, $J_{4a,4}$ 3.0, $J_{4a,4b}$ –14.5, H $4'a$), 3.67дд (1H, $J_{4b,4}$ 6.2, H $4'b$), 3.66дд (1H, $J_{5b,4}$ 6.8, H $5b$), 1.85д (3H, H $5''$).

Смешанную фракцию (220 мг) повторно хроматографировали в тех же условиях.

(\pm)-*цис*-2-Гидроксиметил-4-(тимин-1-илметил)-1,3-диоксолан (XII). Раствор 100 мг (0.29 ммоль) соединения (X) в 5 М аммиаке в метаноле (10 мл) выдерживали 3 сут при 20°C и упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в воде (50 мл) и экстрагировали хлороформом (2 × 10 мл). Водные слои упаривали досуха, остаток кристаллизовали из этанола. Выход 50 мг (71%). R_f 0.37 (B). Т. пл. 160 – 161.5°C. УФ-спектр (вода): λ_{\max} 272 нм (ϵ 10260) при pH 1 – 7, λ_{\max} 271 нм (ϵ 7840) при pH 13. ^1H -ЯМР (D_2O): 7.40к (1H, $J_{6'',5'}$ 1.2, H $6''$), 4.89т (1H, $J_{2,2a} = J_{2,2b}$ 3.0, H 2), 4.37дддд (1H, H 4), 3.94дд (1H, $J_{5b,4}$ 6.8, $J_{5a,5b}$ –8.9, H $5b$), 3.88дд (1H, $J_{4a,4}$ 3.4, $J_{4a,4b}$ –14.6, H $4'a$), 3.77дд (1H, $J_{5a,4}$ 4.7, H $5a$), 3.73дд (1H, $J_{4b,4}$ 7.5, H $4'b$), 3.56дд (1H, $J_{2a,2b}$ –12.7, H $2'a$), 3.52дд (1H, H $2'b$), 1.74д (3H, H $5''$).

(\pm)-*транс*-2-Гидроксиметил-4-(тимин-1-илметил)-1,3-диоксолан (XIII) получали аналогично из 50 мг (0.145 ммоль) соединения (XI). Выход 23 мг (65%), R_f 0.37 (B). Т. пл. 137 – 139°C (этанол). УФ-спектр (вода): λ_{\max} 272 нм (ϵ 9860) при pH 1 – 7; λ_{\max} 271 нм (ϵ 7560) при pH 13. ^1H -ЯМР (D_2O): 7.37к (1H, $J_{6'',5'}$ 1.2, H $6''$), 5.05т (1H, $J_{2,2a} = J_{2,2b}$ 3.1, H 2), 4.40дддд (1H, H 4), 4.08дд (1H, $J_{5a,4}$ 6.4, H $5a$), 3.84дд (1H, $J_{4a,4}$ 3.7, $J_{4a,4b}$ –14.6, H $4'a$), 3.77дд (1H, $J_{4b,4}$ 7.6, H $4'b$), 3.65дд (1H, $J_{5b,4}$ 5.7, $J_{5a,5b}$ –8.8, H $5b$), 3.52дд (1H, $J_{2a,2b}$ –12.6, H $2'a$), 3.48дд (1H, H $2'b$), 1.75д (3H, H $5''$).

2'-Фосфат (\pm)-*цис*-2-гидроксиметил-4-(тимин-1-илметил)-1,3-диоксолана (аммониевая соль) (XIV). К раствору 41 мг (0.17 ммоль) аналога нуклеозида (XIII) в 3 мл абс. пиридиния добавляли 0.5 мл 1 М раствора пиридиневой соли β -циан-этилфосфата в пиридине, упаривали в вакууме досуха, остаток упаривали с абс. пиридином (3 × 3 мл), к остатку добавляли 3 мл абс. пиридина и 0.5 г (2.4 ммоль) N,N'-дициклогексилкарбодиимида. Реакционную смесь выдерживали 3 сут при 20°C. Прибавляли 5 мл воды, перемешивали 1 ч при 20°C, фильтровали, осадок промывали 20% вод-

ным пиридином, объединенные фильтраты экстрагировали эфиром (2 × 20 мл) и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- -форма, объем 150 мл). Колонку промывали водой, элюировали 0.05 M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$; фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5 × 10 мл), к остатку прибавляли 3 мл 1 M NaOH, через 10 мин при 20°C раствор пропускали через колонку с дауэксом 50 (H $^+$ -форма, 8 мл), к элюату добавляли разбавленный раствор NH_4OH до pH 9 и лиофилизовали. Выход аммониевой соли нуклеотида (XIV) 33.5 мг (58%). R_f 0.15 (Г), 0.4 (Д). УФ-спектр (вода): λ_{\max} 272 нм.

2'-Трифосфат (\pm)-*цис*-2-гидроксиметил-4-(тимин-1-илметил)-1,3-диоксолана (натриевая соль) (XV). К раствору 69 мкмоль аммониевой соли нуклеотида (XIV) в 3 мл воды добавляли 25 мкл три-*n*-бутиламина, перемешивали до растворения при 20°C, упаривали в вакууме досуха, упаривали с абс. DMF (3 × 3 мл), остаток растворяли в 2 мл DMF, добавляли 43 мг (0.25 ммоль) N,N'-карбонилдиimidазола и выдерживали 3 ч при 20°C. К смеси прибавляли 28 мкл метанола, через 30 мин добавляли 0.8 мл 0.5 M раствора три-*n*-бутиламмониевой соли пирофосфорной кислоты в абс. DMF. Реакционную смесь выдерживали 16 ч при 20°C, упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 50 мл воды и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- -форма, объем 150 мл). Колонку промывали водой, хроматографировали в градиенте концентрации $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ (0.0 → 0.3 M). Трифосфат (XV) элюировался в концентрации 0.15 M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$. Фракции, содержащие продукт, упаривали досуха, затем упаривали с водой (5 × 20 мл). Остаток растворяли в 5 мл воды, пропускали через колонку с дауэксом 50 (Na^+ -форма, объем 2 мл), элюировали водой, лиофилизовали. Выход трифосфата (XV) 24.4 мг (64%). R_f 0.06 (Г), 0.14 (Д). УФ-спектр (вода): λ_{\max} 272 нм.

Авторы благодарят Международный научный фонд за финансирование настоящей работы (гранты MGA000 и № 23000).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Norbeck D.W., Spanton S., Broder S., Mitsuya H. // Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. P. 6263 – 6266.
2. Kim H.O., Ahn S.K., Alves A.J., Beach W.J., Jeong L.S., Choi B.G., Van Roey P., Schinazi R.F., Chu C.K. // J. Med. Chem. 1992. V. 35. P. 1987 – 1995.
3. Kim H.O., Schinazi R.F., Shanmuganathan K., Jeong L.S., Beach J.W., Nampalli S., Cannon D.L., Chu C.K. // J. Med. Chem. 1993. V. 36. P. 519 – 528.
4. Ефимцева Е.В., Михайлов С.Н., Мешков С.В., Бочкарев А.В., Гурская Г.В. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 103 – 112.

5. Mikhailov S.N., Efimtseva E.V., Meshkov S.V., Lonnberg H. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1993. V. 58. Special Issue. P. 68 - 70.
6. Ogilvie K.K., Hanna H.R., Proba Z. // Nucleosides and Nucleotides. 1986. V. 5. P. 169 - 183.
7. Holy A. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1975. V. 40. P. 187 - 214.
8. Бочкирев А.В., Ефимцева Е.В., Михайлов С.Н., Гурская Г.В. // Кристаллография. 1994. Т. 39. С. 635 - 640.
9. Mikhailov S.N., Efimtseva E.V., Bochkarev A.V., Gurskaya G.V., Viktorova L.S., Kern E.R. // Antiviral Res. 1994. V. 23. Supp. I. P. 69.
10. Tener G.M. // J. Amer. Chem. Soc. 1961. V. 83. P. 159 - 168.
11. Hoard D.E., Ott D.G. // J. Amer. Chem. Soc. 1965. V. 87. P. 1785 - 1788.
12. Розовская Т.А., Мищенко А.В., Тарусова Н.Б., Куханова М.К., Краевский А.А., Бибилашвили Р.Ш. // Молекулярн. биология. 1993. Т. 27. С. 1051 - 1060.
13. Chidgeavadze Z.G., Scamrov A.V., Beabealashvili R.Sh., Kvasyuk E.I., Zaitseva G.V., Mikhailopulo I.A., Kowollig G., Langen P. // FEBS Lett. 1985. V. 183. P. 275 - 278.
14. Preston B.D., Poesz B.J., Loeb L.A. // Science. 1988. V. 242. P. 1168 - 1171.
15. Дяткина Н.Б., Викторова Л.С., Мозжерин Д.Ю., Атражев А.М., Розенберг С.Г., Куханова М.К., Краевский А.А. // Молекуляр. биология. 1991. Т. 25. С. 1688 - 1710.
16. Chidgeavadze Z.G., Beabealashvili R.Sh., Atrazhev A.M., Kukhanova M.K., Azhayev A.V., Krayevsky A.A. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. P. 1671 - 1686.
17. Зайцева В.Е., Дяткина Н.Б., Краевский А.А., Скапцова Н.А., Турнина О.В., Гучев Н.В., Готтих Н.В., Ажаев А.В. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. С. 670 - 680.
18. Розовская Т.А., Белогуров А.А., Лукин М.А., Чернов Д.Н., Куханова М.К., Бибилашвили Р.Ш. // Молекулярн. биология. 1993. Т. 27. С. 618 - 630.
19. Чиджавадзе З.Г., Бибилашвили Р.Ш., Розовская Т.А., Атражев А.М., Тарусова Н.Б., Минасян Ш.Х., Дяткина Н.Б., Атражева Е.Ю., Куханова М.К., Папчихин А.В., Краевский А.А. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. С. 1732 - 1742.
20. Дяткина Н.Б., Янта-Липински М., Минасян Ш.Х., Куханова М.К., Краевский А.А., Чиджавадзе З.Г., Бибилашвили Р.Ш. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. С. 1366 - 1374.
21. Dyatkina N.B., Minassian Sh.H., Kukhanova M.K., Krayevsky A.A., Yanta-Lipinsky M., Chidgeavadze Z.G., Beabealashvili R.Sh. // FEBS Lett. 1987. V. 219. P. 151 - 155.
22. Викторова Л.С., Мозжерин Д.Ю., Розовская Т.А., Куханова М.К., Краевский А.А. // Молекулярн. биология. 1993. Т. 27. С. 143 - 152.

Substrate Properties of Dioxolane Analogs of 3'-Deoxythymidine 5'-Triphosphate in Reactions of DNA Synthesis Catalyzed by Various DNA Polymerases

E. V. Efimtseva*, S. N. Mikhailov*,¹ L. S. Viktorova*,
T. A. Rozovskaya**, and R. Sh. Beabealashvili**

* Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 117984 Russia

** Institute of Experimental Cardiology, Cardiological Research Center,
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Abstract — The substrate properties of 3'-deoxythymidine 5'-triphosphate analogs prepared on the basis of 2,4-disubstituted 1,3-dioxolanes were investigated in reactions of the DNA synthesis catalyzed by various DNA polymerases. The 4'-triphosphates of (\pm)-*cis*-4-hydroxymethyl-2-(1-thyminylmethyl)-1,3-dioxolane and the corresponding (\pm)-*trans*-isomer were shown to be terminating substrates of terminal deoxynucleotidyl transferase. 4'-Triphosphate of (\pm)-*cis*-4-hydroxymethyl-2-(1-thyminylmethyl)-1,3-dioxolane terminates the DNA synthesis catalyzed by HIV reverse transcriptase, whereas 2'-triphosphate of (\pm)-*cis*-2-hydromethyl-4-(1-thyminylmethyl)-1,3-dioxolane is a terminator in the DNA synthesis catalyzed by HIV reverse transcriptase and the Klenow fragment of DNA polymerase I.

Key words: 3'-deoxythymidine 5'-triphosphate analogs, DNA polymerases, reverse transcriptase.

¹ To whom correspondence should be addressed.