



УДК 577.152.277.153

© 1991 г.

З. Г. Чиджавадзе, Р. Ш. Библашвили, Н. Ш. Падюкова*,
С. Н. Михайлов*

ПОЛУЧЕНИЕ

С'-МЕТИЛ-2'-ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ
И ИХ СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА В РЕАКЦИЯХ СИНТЕЗА ДНК,
КАТАЛИЗИРУЕМОГО ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ

Институт экспериментальной кардиологии Всесоюзного кардиологического научного
центра АМН СССР, Москва;

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва

С помощью химико-ферментативных методов из 5'-С-метилтимидинов и 3'-С-метил-2'-дезоксигуанидина синтезированы соответствующие 5'-трифосфаты и изучены их субстратные свойства в реакциях синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразами из различных источников. Показано, что 5'-трифосфаты 5'-С-метилтимидинов являются субстратами и включаются в середину цепи в реакциях, катализируемых ДНК-полимеразой α из тимуса теленка, ДНК-полимеразой I фрагмента Кленова из *E. coli* и обратной транскриптазой вируса птичьего миелобластома.

В предыдущих работах были получены 5'-трифосфаты С'-метилрибонуклеозидов и изучены их субстратные свойства [1—4] в реакциях синтеза РНК, катализируемого ДНК-зависимой РНК-полимеразой *E. coli*. Так, было показано, что этот фермент включает в растущую цепь РНК 5'-трифосфаты 5'-С-метилнуклеозидов *D-алло*- и *L-тало*-ряда с различной эффективностью [3], а 5'-трифосфаты 3'-С-метилнуклеозидов являются терминирующими субстратами для этого фермента [2, 4]. Полученные данные позволили уточнить конформацию нуклеозидтрифосфата в ходе его ферментативного присоединения к растущей цепи РНК [4].

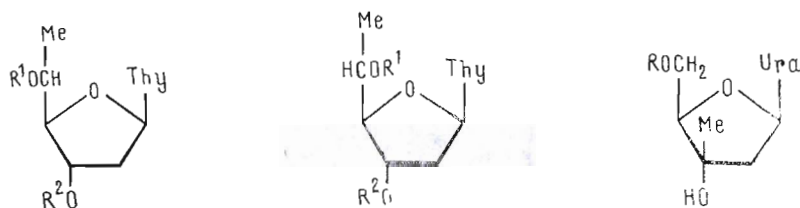
Настоящая работа посвящена получению 5'-трифосфатов С'-метил-2'-дезоксинуклеозидов (I)—(III) и изучению их субстратных свойств в реакциях синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразами различной специфичности. В предыдущих работах были разработаны удобные методы синтеза 5'- и 3'-С-метил-2'-дезоксинуклеозидов (IV)—(VI) [5, 6].

Получение 5'-фосфатов (VII)—(IX) связано с дискриминированием вторичных гидроксильных групп в 5'-С-метилнуклеозидах (IV), (V) и первичной и третичной групп в 3'-С-метилпроизводных (VI). В первом случае это решается с использованием 3'-нуклеотидазной активности нуклеазы S_1 [7, 8]. Продуктами ферментативного гидролиза дифосфатов (VII) и (VIII) являются 5'-монофосфаты (X) и (XI). Обработка нуклеозидов (IV) и (V) избытком β -цианэтилфосфата [9] в присутствии 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида или N,N' -дициклогексилкарбодиимида приводила после щелочного удаления защитной группы к дифосфатам (VII) и (VIII). Аналогичное фосфорилирование нуклеозида (VI) давало 5'-фосфат (IX). 5'-Трифосфаты (I)—(III) были получены затем по методу [10].

В другом варианте синтеза 5'-фосфатов 5'-С-метилтимидинов (X), (XI) использовали ранее полученные дифференциально защищенные 5'-О-бензоаты (XII), (XIII) [5], обработка которых трет-бутилдиметилсилилхлоридом приводила к соединениям (XIV), (XV). После щелочного

Использованные обозначения: TDT — терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (КФ 2.7.7.31).

гидролиза бензоильных групп получали 3'-О-защитенные нуклеозиды (XVI) и (XVII) — исходные для синтеза 5'-фосфатов (IV) и (V).



- | | | | | | |
|-------|--------------------------------|--------|--------------------------------|-------|------------------|
| (I) | $R^1 = P_3O_9H_4, R^2 = H;$ | (II) | $R^1 = P_3O_9H_4, R^2 = H;$ | (III) | $R = P_3O_9H_5;$ |
| (IV) | $R^1 = R^2 = H;$ | (V) | $R^1 = R^2 = H;$ | (VI) | $R = H;$ |
| (VII) | $R^1 = R^2 = PO_3H_2;$ | (VIII) | $R^1 = R^2 = PO_3H_2;$ | (IX) | $R = PO_3H_2;$ |
| (X) | $R^1 = PO_3H_2, R^2 = H;$ | (XI) | $R^1 = PO_3H_2, R^2 = H;$ | | |
| (XII) | $R^1 = OBz, R^2 = H;$ | (XIII) | $R^1 = OBz, R^2 = H;$ | | |
| (XIV) | $R^1 = OBz, R^2 = SiMe_2Bu^t;$ | (XV) | $R^1 = OBz, R^2 = SiMe_2Bu^t;$ | | |
| (XVI) | $R^1 = OH, R^2 = SiMe_2Bu^t;$ | (XVII) | $R^1 = OH, R^2 = SiMe_2Bu^t;$ | | |

Полученные 5'-трифосфаты (I—III) изучались в реакциях синтеза ДНК, катализируемого различными ДНК-полимеразами. На рис. 1 приведена электрофореграмма ПААГ-разделения продуктов синтеза ДНК с использованием 14-звенного праймера и ДНК фага M13mp10, катализируемого обратной транскриптазой вируса птичьего миелобластома и концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (TDT) в присутствии разных аналогов субстратов. Как видно из рисунка, при катализе реакции обратной транскриптазой (треки 3, 6) аналоги субстратов (I), (II) включаются в 3'-конец ДНК 14-звенного дезоксирибонуклеотида (полоса T¹⁵), а при добавлении всех четырех dNTP (треки 2, 7) происходит дальнейшее удлинение, т. е. аналоги могут включаться в середину цепи, тогда как трифосфат (III) не является субстратом ни для обратной транскриптазы (треки 4, 5), ни для TDT (не показано). В реакции, катализируемой TDT, *D*-рибо-производное (I) не является субстратом (треки 9, 10), а *L*-ликто-производное (II) включается в 3'-конец олигонуклеотида (трек 11), хотя его дальнейшее удлинение при добавлении dTTP затруднено (трек 12). Следует отметить, что оба 5'-С-метильных производных рибо-UTP не являются субстратами для этого фермента [3].

В реакции синтеза ДНК, катализируемой ДНК-полимеразой α из тимуса телят и ДНК-полимеразой I фрагмента Кленова из *E. coli* субстратами оказались оба изомера 5'-С-метилтимидина. Производное (III) не является субстратом и для этих двух полимераз (не показано).

На рис. 2 представлена электрофореграмма синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой I (фрагмента Кленова) в присутствии аналога (II). Как видно из рисунка, во время синтеза ДНК в присутствии этого аналога при катализе реакции двумя разными партиями ДНК-полимеразы I фрагмента Кленова, аналог субстрата включается в 3'-конец цепи (треки 2, 4, полоса T¹⁵). На добавление к реакционной смеси всех четырех dNTP эти две ДНК-полимеразы реагируют по-разному. При катализе реакции одной ДНК-полимеразой происходит включение только одного нуклеотида (трек 3, полоса G¹⁶), тогда как в случае второй ДНК-полимеразы происходит обычное удлинение праймера и полоса G¹⁶ не появляется. Этот эффект нам не удалось объяснить, так как обе полимеразы дают одну-единственную полосу в SDS-гель-электрофорезе, а также не обладают примесными активностями.

3'-С-Метильное производное dUTP (III) не является субстратом ни для одной из исследованных ДНК-полимераз и не включается в 3'-конец синтезируемой цепи и поэтому не является терминатором синтеза в отличие от вышеупомянутого 5'-трифосфата 3'-С-метил-*D*-рибонуклеотида, эффективного терминатора синтеза РНК, катализируемого РНК-полимеразой *E. coli* [2].

[4]) или межмолекулярного наталкивания объемной метильной группы на гетероциклическое основание или аминокислотные остатки белка. Для выяснения этих особенностей в настоящее время проводится конформационный анализ.

Экспериментальная часть

УФ-Спектры снимали в воде на приборе Specord UV-VIS (ГДР). Спектры ПМР регистрировали на спектрометре Varian XL-100 (США) с рабочей частотой 100 МГц при 35° С. Химические сдвиги протонов (δ) приведены относительно стандарта Me_4Si для растворов в CDCl_3 , для растворов в D_2O измерения проводили с внутренним стандартом *трет*-бутанолом и пересчитывали относительно Me_4Si , принимая химический сдвиг *трет*-бутанола относительно Me_4Si равным 1,27 м. д. Величины КССВ (J) измерены в герцах. Препаративную хроматографию проводили на силикагеле L 40—100 (ЧСФР), ТСХ — на силуфоле UV₂₅₄ (ЧСФР) в системах CHCl_3 (А); CHCl_3 —EtOH, 98 : 2 (Б); CHCl_3 —EtOH, 95 : 5 (В); *i*-PrOH — NH_4OH — вода, 7 : 1 : 2 (Г); 1 М LiCl (Д) (пластинки с РЕЦеллюлозой).

2'-Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Sigma, США) и $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ с удельной активностью 1000—3000 Ки/ммоль (Amersham, Англия) использовались без дополнительной очистки. Все соли отечественного производства были категории ос. ч. В работе применяли рентгеновскую пленку РМ-В Шосткинского производственного объединения «Свема» (СССР).

ДНК-полимераза I (КФ 2.7.7.7), фрагмент Кленова, из *E. coli* была любезно предоставлена Л. П. Савочкиной (ВКНЦ АМН СССР). Фермент гомогенен с удельной активностью 20 000 ед./мг. ДНК-полимераза α (КФ 2.7.7.7) и концевая дезоксиноклеотидилтрансфераза (ТДТ) (КФ 2.7.7.31) из тимуса телянка были выделены модифицированными методами [11] и [12] соответственно. Удельная активность ферментов составляла 5000 ед./мг. Обратная транскриптаза (КФ 2.7.7.49) из вируса птичьего миелобластома была любезно предоставлена А. А. Шевелевым (ВКНЦ АМН СССР). Удельная активность фермента составляла 12 ед./мкл.

ДНК. Синтетический олигонуклеотидный праймер d(CCCAGTCCAGACGTC), любезно предоставленный А. В. Ажаевым (ВНИИ биотехнологии, Москва), был мечен по 5'-концу с помощью $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и T4-полинуклеотидкиназы по [13]. Олигонуклеотид был очищен на Nensorb-20 (Du Pont, США) и использовался как для синтеза с матрицы одноцепочечной ДНК фага M13mp10, выделенной по методике [14], так и для безматричного синтеза, катализируемого ТДТ.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) осуществляли по [15].

Ферментативные реакции. Реакция синтеза ДНК, катализируемая обратной транскриптазой вируса птичьего миелобластома, проводилась в инкубационной системе объемом 20 мкл, содержащей 35 мМ трис-НСl (рН 8,4), 6 мМ MgCl_2 , 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мМ NaCl, 0,1 мкг ДНК M13mp10 и эквивалентное количество меченного по 5'-концу праймера. Реакция инициировалась добавлением 6 ед. акт. фермента при 42° С.

Реакции, катализируемые ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) из *E. coli* и ДНК-полимеразой α из тимуса телянка, проводились в инкубационной системе объемом 20 мкл, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 5 мМ MgCl_2 , 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мкг M13mp10 ДНК и эквивалентное количество меченного по 5'-концу праймера. Реакцию инициировали добавлением 2 и 4 ед. акт. ДНК-полимеразы I и ДНК-полимеразы α соответственно. Реакция проводилась при 37° С.

Реакция, катализируемая ТДТ, проводилась в инкубационной системе объемом 20 мкл, содержащей 100 мМ калий-какодилат (рН 6,5), 5 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ CoCl_2 , 5 мМ 2-меркаптоэтанол и 1 мкМ меченный по 5'-концу олигонуклеотид. Реакцию проводили при 37° С и инициировали добавлением 1 ед. фермента.

Концентрации дезоксиноклеозидтрифосфатов, аналогов нуклеотидов

и времена реакции даны в подписях к рисункам. Все указанные выше реакции останавливали добавлением EDTA.

3',5'-Дифосфат 1-(2',6'-дидезокси-β-D-рибо-гексофуранозил)тимина (VII). К раствору 256 мг (1 ммоль) нуклеозида (IV) в 10 мл абс. пиридина добавляли 4 мл 1 М раствора пиридиниевой соли β-цианэтилфосфата и 1,8 г (6 ммоль) 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлаорида и смесь выдерживали 3 ч при 20° С, добавляли 20 мл воды, экстрагировали эфиром и водный слой наносили на колонку с DEAE-Тоуорpearl (50 мл, HCO₃⁻-форма). Колонку промывали водой и элюировали градиентом концентрации NH₄HCO₃. Фракции, содержащие цианэтиловые эфиры дифосфата, объединяли (элюирующая концентрация 0,06 М), упаривали в вакууме досуха и упаривали с водой (2 × 10 мл). Остаток обрабатывали 15 мин при 20° С 25 мл 1 М NaOH, щелочной раствор пропускали через колонку с дауэксом-50 (H⁺-форма, 50 мл) и продукт элюировали водой. После дополнительной очистки на колонке с DEAE-Тоуорpearl (50 мл) получали 200 мг (41%) аммониевой соли дифосфата (VII). R_f 0,10 (Г). ПМР (D₂O): 7,66 к (1Н, J_{6,5} 1,2, Н6), 6,34 дд (1Н, J_{1',2'a} 6,5, J_{1',2'b} 8,0, Н1'), 4,70—4,10 м (3Н, Н3', Н4' и Н5'), 2,48 м (2Н, Н2'а и Н2'б), 1,95 д (3Н, 5-Ме), 1,40 д (3Н, J_{6',5'} 6,5, Н6').

3',5'-Дифосфат 1-(2',6'-дидезокси-α-L-ликто-гексофуранозил)тимина (VIII) получали аналогичным фосфорилированием нуклеозида (V) с выходом 37%. R_f 0,10 (Г). ПМР (D₂O): 7,90 к (1Н, J_{6,5} 1,2, Н6), 6,42 дд (1Н, J_{1',2'a} 6,5, J_{1',2'b} 7,0, Н1'), 4,80—4,20 м (3Н, Н3', Н4' и Н5'), 2,48 м (2Н, Н2'а и Н2'б), 1,96 д (3Н, 5-Ме), 1,44 д (3Н, J_{6',5'} 6,5, Н6').

5'-Фосфат 1-(3'-С-метил-2'-дезокси-β-D-эритро-пентофуранозил)урацила (IX) получали аналогичным фосфорилированием нуклеозида (VI) с последующим щелочным гидролизом β-цианэтильной группы. Выход 35%. R_f 0,26 (Г). УФ-спектр: λ_{max} 260 нм. ПМР (D₂O): 7,90 д (1Н, J_{6,5} 8,0, Н6), 6,30 дд (1Н, J_{1',2'a} 6,0, J_{1',2'b} 8,5, Н1'), 5,80 д (1Н, Н5), 4,20—3,70 м (3Н, Н4', Н5'а и Н5'б), 2,43—2,18 м (2Н, Н2'а и Н2'б), 1,43 с (3Н, С3'-Ме).

5'-Фосфат 1-(2',6'-дидезокси-β-D-рибо-гексофуранозил) тимина (X) синтезировали двумя способами.

А. Раствор 243 мг (0,5 ммоль) дифосфата (VII) в 1,65 мл 10⁻⁵ М раствора ZnCl₂ инкубировали с нуклеазой S₁ *Aspergillus orizae* (КФ 3.1.30.1; 5500 ед. акт.) 13 сут при 37° С. Раствор наносили на колонку с сефадексом G-15, элюировали 0,01 М NH₄HCO₃ и наносили на колонку с DEAE-Тоуорpearl (50 мл). Колонку промывали водой и элюировали градиентом концентрации NH₄HCO₃. Выход аммониевой соли фосфата (X) 85 мг (46%) (элюирующая концентрация 0,06 М) и 120 мг (49%) исходного дифосфата (VII). R_f 0,28 (Г). УФ-спектр: λ_{max} 267 нм. ПМР (D₂O): 7,63 к (1Н, J_{6,5} 1,2, Н6), 6,30 дд (1Н, J_{1',2'a} 7,0, J_{1',2'b} 7,5, Н1'), 4,60—3,90 м (3Н, Н3', Н4' и Н5'), 2,34 м (2Н, Н2'а и Н2'б), 1,93 д (3Н, 5-Ме), 1,38 д (3Н, J_{6',5'} 6,5, Н6').

Б. К раствору 450 мг (1,2 ммоль) соединения (XVI) в 10 мл абс. пиридина добавляли 2,4 мл 1 М раствора пиридиниевой соли β-цианэтилфосфата и 1,08 г (3,6 ммоль) 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлаорида, смесь выдерживали 3 ч при 20° С, добавляли 20 мл воды, экстрагировали эфиром и водный слой наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (50 мл). Колонку промывали водой и элюировали 0,05 м NH₄HCO₃. Фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5 × 10 мл) и сушили. Остаток растворяли в 10 мл 1 М раствора тригидрата тетрабутиламмонийфторида в тетрагидрофуране и раствор выдерживали 2 ч при 20° С. Смесь упаривали досуха, к остатку добавляли 100 мл хлороформа и 100 мл воды, водный слой отделяли и упаривали досуха. Остаток растворяли в 40 мл 1 М NaOH, выдерживали 10 мин при 20° С, раствор пропускали через колонку с дауэксом-50 (H⁺-форма, 50 мл), элюировали водой и после повторной хроматографии на колонке с DEAE-Тоуорpearl в градиенте концентрации NH₄HCO₃ получали продукт с выходом 68%.

5'-Фосфат 1-(2',6'-дидезокси-α-L-ликто-гексофуранозил)тимина (XI).

А. Получали аналогичным ферментативным дефосфорилированием 205 мг (0,42 ммоль) нуклеотида (VIII). Выход 45%. (Также было выделено 113 мг (55%) исходного дифосфата.) R_f 0,27 (Г). УФ-спектр: λ_{\max} 268 нм. ПМР (D_2O): 7,95 к (1H, $J_{6,5}$ 1,2, H6), 6,42 т (1H, $J_{1',2'a} = J_{1',2'b} = 7,2$, H1'), 4,70—4,00 м (3H, H3', H4' и H5'), 2,42 м (2H, H2'a и H2'b), 1,99 д (3H, 5-Me), 1,44 д (3H, $J_{6',5'}$ 6,5, H6').

Б. Получали фосфорилированием соединения (XVII) с последующим удалением защитных групп с выходом 52%, как описано выше для (X).

5'-Трифосфат 1-(2',6'-дидезокси-β-D-рибо-гексофуранозил)тимина (I). К раствору 115 мг (0,31 ммоль) три-*n*-бутиламмониевой соли фосфата (X) в 5 мл абс. DMF добавляли 162 мг (1 ммоль) N,N'-карбонилдидимдазола и выдерживали 1 ч при 20° С. К смеси добавляли 1,2 мл 1 М раствора метанола в DMF и через 20 мин при 20° С 1,6 мл 1 М раствора три-*n*-бутиламмониевой соли пирогосфорной кислоты в DMF. Смесь выдерживали 16 ч при 20° С, упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 50 мл воды и наносили на колонку с 50 мл DEAE-целлюлозы. Колонку промывали водой и элюировали градиентом концентрации NH_4HCO_3 (элюирующая концентрация 0,21 М). Выход 72 мг (41%). R_f 0,07 (Д). ПМР (D_2O): 7,54 к (1H, $J_{6,5}$ 1,2, H6), 6,25 т (1H, $J_{1',2'a} = J_{1',2'b} = 7,2$, H1'), 4,60—3,90 м (3H, H3', H4' и H5'), 2,27 м (2H, H2'a и H2'b), 1,88 д (3H, 5-Me), 1,38 д (3H, $J_{6',5'}$ 6,5, H6').

5'-Трифосфат 1-(2',6'-дидезокси-α-L-ликсо-гексофуранозил)тимина (II) получали аналогично из монофосфата (XI). Выход 32%. R_f 0,07 (Д). ПМР (D_2O): 7,83 к (1H, $J_{6,5}$ 1,2, H6), 6,37 т (1H, $J_{1',2'a} = J_{1',2'b} = 7,0$, H1'), 4,60—4,00 м (3H, H3', H4' и H5'), 2,37 м (2H, H2'a и H2'b), 1,95 д (3H, 5-Me), 1,42 д (3H, $J_{6',5'}$ 6,5, H6').

5'-Трифосфат 1-(3'-С-метил-β-D-рибофуранозил)урацила (III) получали аналогично из монофосфата (IX). Выход 32%. R_f 0,06 (Д).

1-(5'-О-Бензоил-3'-О-трет-бутилдиметилсилил-2',6'-дидезокси-β-D-рибо-гексофуранозил)тимин (XIV). К раствору 1,1 г (3,05 ммоль) соединения (XII) в 50 мл абс. пиридина добавляли 713 мг (8,9 ммоль) имидазола, 616 мг (4,1 ммоль) трет-бутилдиметилсилилхлорида и смесь выдерживали 48 ч при 20° С. К раствору добавляли 5 мл метанола, упаривали в вакууме досуха, упаривали с толуолом (2 × 10 мл) и к остатку добавляли 200 мл хлороформа и 100 мл воды. Органический слой отделяли, промывали 10% $NaHCO_3$, водой и сушили Na_2SO_4 . Фильтрат упаривали досуха и остаток хроматографировали на колонке с 40 г силикагеля в системе А. Выход 1,0 г (69%). R_f 0,83 (В) (пена). ПМР ($CDCl_3$): 8,25 ус (1H, NH), 8,00—7,29 м (5H, Bz), 6,91 к (1H, $J_{6,5}$ 1,2, H6), 6,22 дд (1H, $J_{1',2'a}$ 5,8, $J_{1',2'b}$ 8,3, H1'), 5,36 дк (1H, $J_{5',4'}$ 4,0, $J_{5',6'}$ 6,5, H5'), 4,55 ддд (1H, $J_{3',2'a}$ 2,5, $J_{3',2'b}$ 5,5, $J_{3',4'}$ 3,0, H3'), 3,98 дд (1H, H4'), 2,29 ддд (1H, $J_{2'a,2'b}$ —13,0, H2'a), 2,00 ддд (1H, H2'b), 1,43 д (3H, $J_{6',5'}$ 6,5, H6'), 1,42 д (3H, 5-Me), 0,89 с (9H, Bu'), 0,11 с (6H, 2 × Me).

1-(5'-О-Бензоил-3'-О-трет-бутилдиметилсилил-2',6'-дидезокси-α-L-ликсо-гексофуранозил)тимин (XV) получали аналогично из 700 мг (1,9 ммоль) соединения (XIII). Выход 700 мг (76%) (пена). R_f 0,81 (В). ПМР ($CDCl_3$): 8,35 ус (1H, NH), 8,05—7,27 м (5H, Bz), 7,36 к (1H, $J_{6,5}$ 1,2, H6), 6,26 дд (1H, $J_{1',2'a}$ 6,0, $J_{1',2'b}$ 7,5 H1'), 5,36 дк (1H, $J_{5',4'}$ 3,5, $J_{5',6'}$ 6,5, H5'), 4,28 ддд (1H, $J_{3',2'a}$ 3,0, $J_{3',2'b}$ 6,0, $J_{3',4'}$ 4,0, H3'), 3,96 дд (1H, H4'), 2,30 ддд (1H, $J_{2'a,2'b}$ —13,0, H2'a), 2,00 ддд (1H, H2'b), 1,88 д (3H, 5-Me), 1,48 д (3H, $J_{6',5'}$ 6,5, H6'), 0,88 с (9H, Bu'), 0,08 с (6H, 2 × Me).

1-(3'-О-трет-Бутилдиметилсилил-2',6'-дидезокси-β-D-рибо-гексофуранозил)тимин (XVI). Раствор 0,9 г (1,9 ммоль) соединения (XIV) в 20 мл 0,2 М раствора метилата натрия в метаноле выдерживали 2,5 ч при 20° С и нейтрализовали сухим дауксом-50 (H^+ -форма). Фильтрат упаривали в вакууме досуха и остаток хроматографировали на колонке с 40 г силикагеля сначала в системе Б, а затем в В. Выход 450 мг (64%) (сироп). R_f 0,27 (В). ПМР ($CDCl_3$): 8,50 ус (1H, NH), 7,21 к (1H, $J_{6,5}$ 1,2, H6), 6,01 т (1H, $J_{1',2'a} = J_{1',2'b} = 7,0$ H1'), 4,47 дт (1H, $J_{3',2'a} = J_{3',4'}$ =

= 3,0, $J_{3',2'6}$ 5,0, H3'), 3,98 дк (1H, $J_{5',4'}$ 4,0, $J_{5',6'}$ 6,5, H5'), 3,62 дд (1H, H4'), 2,22 м (2H, H2'а и H2'б), 1,89 д (3H, 5-Me), 1,37 д (3H, $J_{6',5'}$ 6,5, H6'), 0,89 с (9H, Bu^t), 0,09 с (6H, 2 × Me).

1-(3'-О-трет-Бутилдиметилсиллил-2',6'-дидезокси-α-L-лихсо-гексофуранозил)тимин (XVII) получали аналогично из 600 мг (1,27 ммоль) соединения (XV). Выход 200 мг (43%) (сироп). R_f 0,25 (В). ПМР (CDCl₃): 8,60 ус (1H, NH), 7,35 к (1H, $J_{6,5}$ 1,2, H6), 6,08 т (1H, $J_{1',2'a} = J_{1',2'b} = 6,7$, H1'), 4,38 дт (1H, $J_{3',2'a} = J_{3',4'}$ 3,5, $J_{3',2'b}$ 6,0, H3'), 3,87 дк (1H, $J_{5',4'}$ 3,0, $J_{5',6'}$ 6,5, H5'), 3,66 дд (1H, H4'), 2,24 м (2H, H2'а и H2'б), 1,87 д (3H, 5-Me), 1,27 д (3H, $J_{6',5'}$ 6,5, H6'), 0,88 с (9H, Bu^t), 0,07 с (6H, 2 × Me).

Авторы благодарят МНТК «Биоген» и Совет по научным проблемам СПИД АМН СССР за частичное финансирование настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mikhailov S. N. // Nucleosides and Nucleotides. 1988. V. 7. № 5—6. P. 679—682.
2. Айвазашвили В. А., Михайлов С. Н., Падюкова Н. Ш., Карпейский М. Я., Библашвили Р. Ш. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 713—715.
3. Айвазашвили В. А., Михайлов С. Н., Падюкова Н. Ш., Библашвили Р. Ш., Карпейский М. Я. // Молекулярн. биология. 1987. Т. 21. № 4. С. 1080—1091.
4. Савочкина Л. П., Свириева Т. В., Бейгельман Л. Н., Падюкова Н. Ш., Кузнецов Д. А., Лысов Ю. П., Михайлов С. Н., Библашвили Р. Ш. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 6. С. 1700—1710.
5. Падюкова Н. Ш., Фомичева М. В., Михайлов С. Н., Янта-Липински М. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 5. С. 668—673.
6. Михайлов С. Н., Фомичева М. В. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 5. С. 692—700.
7. Saffhill R., Hall J. // J. Carbohydr. Nucleosides and Nucleotides. 1981. V. 8. № 6. P. 573—583.
8. Карпейский М. Я., Мамаева О. К., Михайлов С. Н., Падюкова Н. Ш., Яковлев Г. И., Смирт И. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 496—504.
9. Tener G. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1961. V. 83. № 1. P. 159—168.
10. Hoard D. E., Ott D. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1965. V. 87. № 8. P. 1785—1788.
11. Grosse F., Krauss G. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 19. P. 5470—5475.
12. Bollum F. J., Chang L. M. S., Tripolis C. H., Dorson J. W. // Meth. Enzymol. 1974. V. 24. P. 347—395.
13. Cameron V., Uhlenbeck O. C. // Biochemistry. 1977. V. 16. № 23. P. 5120—5126.
14. M13 Cloning and Sequencing Handbook. Amersham. 1984. P. 27—28.
15. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.

Поступила в редакцию
21.VI.1990

Z. G. CHIDGEAVADZE, R. Sh., BEABEALASHVILLI, N. Sh. PADYUKOVA*,
S. N. MIKHAILOV*

SYNTHESIS AND SUBSTRATE PROPERTIES OF C'-METHYL-2'-DEOXYNUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATES IN DNA SYNTHESIS REACTIONS CATALYSED BY DNA POLYMERASES

All-Union Cardiology Research Centre, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Moscow;

* V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

Starting from the earlier prepared 5'-C-methylthymidines and 3'-C-methyl-2'-deoxyuridine, corresponding 5'-triphosphates were prepared and investigated in DNA synthesis reactions catalysed by DNA polymerases from different sources.