



УДК 577.113.3

## СИНТЕЗ И НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОСФОНИЛЬНЫХ АЦИКЛИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ 2'-ДЕЗОКСИАДЕНОЗИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

© 1995 г. Д. В. Малахов, Д. Г. Семизаров, М. В. Ясько

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
117984, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 09.12.93 г. После доработки 26.10.94 г.

Осуществлен синтез 9-[2-(фосфонометилкарбониламино)этил]аденина, его изомера – 9-[(2-фосфоноэтил)аминокарбонилметил]аденина и 9-[2-[(2-фосфоноэтил)карбониламино]этил]аденина и их дифосфатов. Показано, что все три дифосфата включаются в 3'-конец цепи ДНК при катализе синтеза обратной транскриптазой вируса миелобластома птиц, но не являются субстратами ДНК полимераз  $\alpha$  из плаценты человека и  $\beta$  из тимуса телят, а также концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы из тимуса телят.

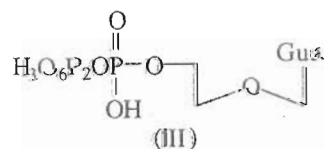
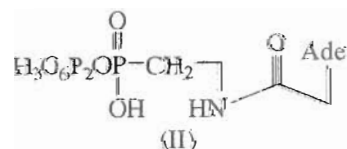
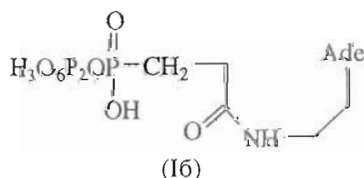
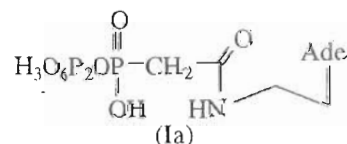
*Ключевые слова:* нуклеозиды; нуклеотиды, аналоги.

Среди различных фосфонильных ациклических аналогов нуклеотидов наиболее известны в качестве антиретровирусных агентов фосфонометоксильные производные, например 9-(2-фосфонометоксиэтил)аденин [1, 2]. Известны также фосфоноалкильные и фосфонометоксильные аналоги ациклогуанозина, обладающие активностью против вируса герпеса [3, 4]. В недавно опубликованной работе [5] отмечается антигерпесная и антиретровирусная активность некоторых ациклических фосфонильных аналогов, содержащих двойную связь в  $\alpha$ -положении к атому фосфора.

Также сообщалось о способности трифосфата 9-(гидроксиэтиламинокарбонилметил)аденина проявлять свойства терминаторного субстрата ДНК-полимераз [6], однако соответствующий нуклеозидный аналог и его гомологи не обладали цитотоксичностью и антивирусной активностью в культурах клеток [7]. По-видимому, такие ациклические аналоги нуклеозидов не превращаются в клетке в соответствующие трифосфаты.

Нами были синтезированы три ациклических фосфонильных аналога, имитирующих нуклеозидмонофосфат, а также их дифосфаты. Изучена способность последних проявлять свойства тер-

минаторных субстратов по отношению к различным ДНК-полимеразам.



Структура двух синтезированных соединений (Ia) и (II) моделирует ациклогуанозинтрифосфат (III) – активную внутриклеточную форму ациклогуанозина (ацикловира), но в то же время ациклический компонент в них содержит элементы жесткости за счет амидной группы. Некоторые

Сокращения: CDI – N,N'-карбонилдиимдазол, ОТ – обратная транскриптаза, ВИЧ – вирус иммунодефицита человека, ВМП – вирус миелобластома птиц, TdT – терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза.

нуклеозид-5'-трифосфаты, содержащие в молекуле "жесткий" фрагмент, являются терминаторными субстратами [8, 9]. Соединение (Iб) можно рассматривать как ациклический аналог ddATP. Выбор в качестве гетероциклического основания аденина был обусловлен как соображениями удобства химического синтеза, так и сообщением А. Бапафа и соавт. [10], в котором указывается, что ациклоаденозинтрифосфат может проявлять больший ингибирующий эффект, чем ациклогуанозинтрифосфат.

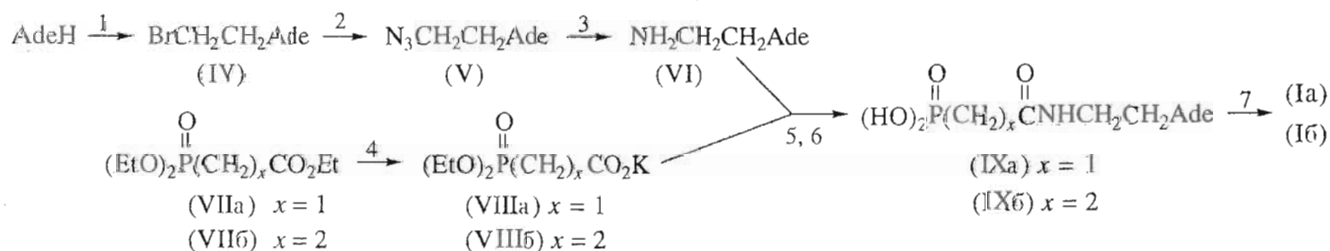
Синтез одной группы соединений приведен на схеме 1. Реакцией аденина с 1,2-дибромэтаном в присутствии гидрида натрия был получен 9-(2-бромэтил)аденин (IV), в котором бром был далее замещен на азидогруппу. Восстановление этой группы привело к 9-(2-аминоэтил)аденину (VI), который конденсировали с диэтилфосфоуксусной (VIIa) или диэтилфосфопропионовой (VIIб) кислотами при активации CDI. В результате деблокирования образовавшихся диэтиловых эфиров с использованием триметилбромсилана

были получены фосфонильные производные (IXa) и (IXб).

Синтез второй группы соединений (схема 2) был осуществлен начиная с алкилирования аденина этиловым эфиром бромуксусной кислоты в присутствии бис(триметилсилил)амида калия; использование такого основания вместо NaN позволило сократить время реакции и превзойти выход, указанный в работе [7]. Образовавшийся эфир (X) далее бензоилировали по аминогруппе аденина и в условиях контролируемого щелочного гидролиза получали карбоновую кислоту (XI), которую конденсировали с диэтил-2-аминоэтилфосфонатом (XIV) в присутствии CDI. Удаление этильных групп действием  $\text{Me}_3\text{SiBr}$  и дебензоилирование под действием водного аммиака привело к соединению (XVI).

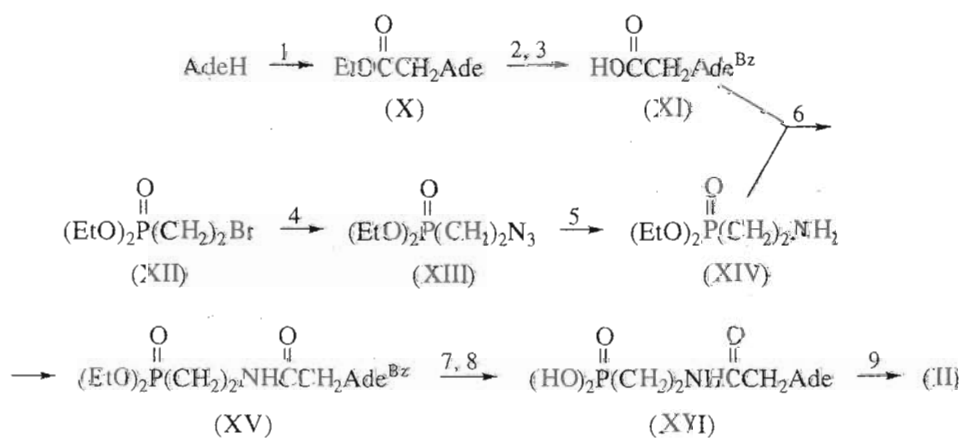
$\beta, \gamma$ -Дифосфаты (Ia), (Iб) и (II) были получены с помощью активации CDI соответственно (IXa), (IXб) и (XVI) с последующей реакцией с пирофосфатом по методу [11].

Структура синтезированных соединений подтверждена данными ЯМР- и масс-спектрометрии;



Реагенты: 1 – NaN/DMF,  $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ; 2 –  $\text{NaN}_3$ /DMF; 3 –  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ; 4 – KOH/EtOH; 5 – CDI; 6 –  $\text{Me}_3\text{SiBr}$ ; 7 – CDI,  $(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ /DMF.

Схема 1.



Реагенты: 1 –  $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{NK}$ /DMF,  $\text{EtOCCCH}_2\text{Br}$ ; 2 –  $\text{BzCl/Py}$ ; 3 – KOH/EtOH; 4 –  $\text{NaN}_3$ /DMF; 5 –  $\text{H}_2$ /Pd/C; 6 – CDI; 7 –  $\text{Me}_3\text{SiBr}$ ; 8 –  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ; 9 – CDI,  $(\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ /DMF.

Схема 2.



Рис. 1. Праймер-матричный комплекс.

полимеразами α из плаценты человека и β из тимуса теленка (рис. 2, серии Б, Г, Д, дорожки 3, 4), а также TdT (данные не приведены). Соединения (Ia) и (II) проявили близкие субстратные свойства, но при этом не узнавались ДНК-полимеразой I (данные не приведены).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Диэтиловый эфир 2-бромэтилфосфоновой кислоты (VII) и триэтил-3-фосфонопропионат (VIIб) были получены по методике [12], диэтилфосфоноуксусная кислота (VIIа) – по методике [13]. Раствор бис(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфата в DMF готовили по методике [14]. Использовались DEAE-целлюлоза DE-32 фирмы Whatman (в HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форме); азид натрия, 10% Pd/C, Kieselgel 60 (63 - 100 мкм) и LiChroprep RP-18 (25 - 40 мкм) фирмы Merck; триметилбромсилан, 1,2-дибромэтан, 80% суспензия NaN в минеральном масле, триэтилфосфит, триэтилфосфоацетат, аденин, трифенилфосфин, бис(триметилсилил)амид калия и CDI фирмы Fluka; дауэкс 50 WX 8 фирмы Serva; пиридин и DMF фирмы Aldrich.

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектры сняты на приборе Varian XL-100-15 (США) с рабочей частотой 100 МГц (внутренний стандарт – *трет*-бутанол). <sup>13</sup>C-ЯМР-спектры (62.89 МГц, с подавлением расщепления на протонах, внутренний стандарт – 1,4-диоксан)

их УФ-спектры соответствуют аденозиновым производным (данные не приводятся). Гомогенность веществ контролировалась с помощью ТСХ на силикагеле, а также на основании данных ЯМР-спектromетрии.

Были изучены субстратные свойства синтезированных соединений (Ia), (Iб) и (II) по отношению к некоторым ОТ ретровирусов, ДНК-полимеразам млекопитающих, фрагменту Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli* и TdT из тимуса теленка. Исследования проводили в системе, содержащей 5'-<sup>32</sup>P-меченый праймер-матричный комплекс (рис. 1), фермент и одно из исследуемых соединений или же, для контроля, природный субстрат dTTP.

Из рис. 2 (серии А и В, дорожки 3, 4) видно, что соединение (Iб) проявило субстратные свойства по отношению к ОТ ВМП и фрагменту Кленова ДНК-полимеразы I. В то же время оно не включалось в растущую цепь ДНК в реакциях удлинения праймера, катализируемых ОТ ВИЧ, ДНК-

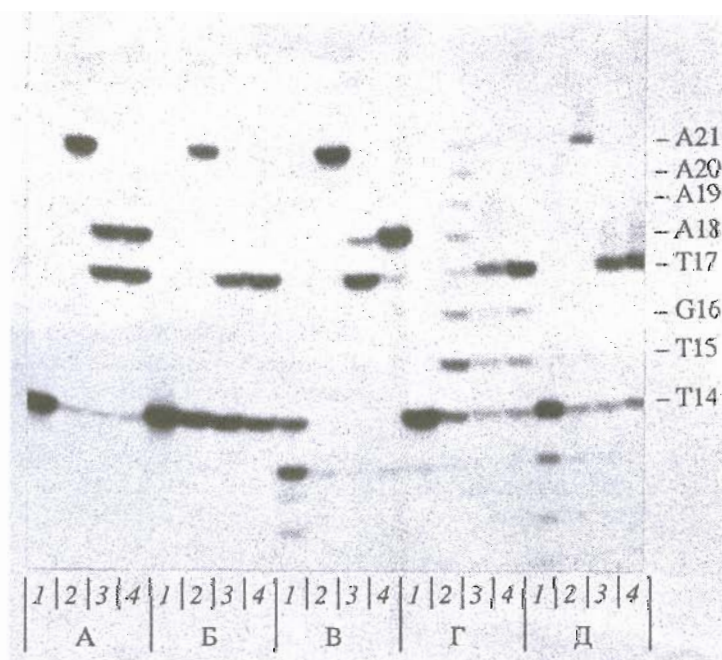


Рис. 2. Электрофорезграмма продуктов реакции элонгации 14-членного праймера ОТ ВМП (серия А), ОТ ВИЧ (Б), ДНК-полимеразой I, фрагмент Кленова (В), ДНК-полимеразой β из тимуса теленка (Г) и ДНК-полимеразой α из плаценты человека (Д). Дорожка 1 – 5'-<sup>32</sup>P-меченый праймер-матричный комплекс (контроль); 2 – то же + 5 мкМ dTTP + 5 мкМ dGTP + 5 мкМ dATP; 3 – то же + 5 мкМ dTTP + 5 мкМ dGTP + 10 мкМ (Iб); 4 – то же + 5 мкМ dTTP + 5 мкМ dGTP + 100 мкМ (Iб).

и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектры (101.27 МГц, без подавления расщепления на протонах, внешний стандарт – 85% фосфорная кислота) сняты на приборе Bruker WM-250 (США). Величины КССВ ( $J$ ) измерены в герцах. При описании  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров приняты следующие сокращения: с – синглет, д – дублет, т – триплет, к – квартет, м – мультиплет, ус – уширенный синглет, дд – дублет дублета, дт – дублет триплета, дк – дублет квартета. Масс-спектры в режиме FAB выполнены на спектрометре Kratos MS 50ТС, образцы смешивались с глицерином. Температуры плавления были определены на приборе РНМК (Германия).

**9-(2-Бромэтил)аденин (IV).** К интенсивно перемешиваемой суспензии 2.7 г (20 ммоль) аденина в 60 мл DMF прибавляли 0.6 г (20 ммоль) 80% NaH, а через 1 ч приливали 4 мл (46 ммоль) 1,2-дибромэтана. Перемешивали 20 ч при 20°C, нейтрализовали 0.1 М HCl, упаривали. Остаток промывали гексаном и дважды перекристаллизовывали из воды. Выход 2.68 г (55%), т. пл. >300°C (с разл.).  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMSO- $d_6$ ;  $\delta$ , м. д.,  $J$ , Гц): 8.15с (2H, H-2, H-8), 7.18с (2H, NH<sub>2</sub>), 4.55т (2H,  $J$  6, CH<sub>2</sub>Ade), 3.96т (2H,  $J$  6, CH<sub>2</sub>Br). Масс-спектр,  $m/z$ : 242, 244 (1 : 1) (MH<sup>+</sup>).

**9-(2-Азидоэтил)аденин (V).** К раствору 0.6 г (2.5 ммоль) бромида (IV) в 10 мл DMF добавляли 0.3 г (4.6 ммоль) NaN<sub>3</sub>, перемешивали 10 ч при 20°C, упаривали, остаток перекристаллизовывали из воды. Выход 0.45 г (89%), т. пл. 184.5°C.  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMSO- $d_6$ ): 8.15с (2H, H-2, H-8), 7.18с (2H, NH<sub>2</sub>), 4.31т (2H,  $J$  6, CH<sub>2</sub>Ade), 3.84т (2H,  $J$  6, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>). Масс-спектр,  $m/z$ : 205 (MH<sup>+</sup>).

**9-(2-Аминоэтил)аденин (VI).** К раствору 400 мг (1.96 ммоль) азида (V) в 30 мл диоксана добавляли 790 мг (3 ммоль) трифенилфосфина, через 1 ч при 20°C обрабатывали 20 мл 25% водного аммиака. Через 2 ч упаривали, прибавляли 30 мл воды, отфильтровывали, фильтрат наносили на колонку (3 × 5 см) с дауэксом 50 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), элюировали 1% водным аммиаком. Фракции, содержащие соединение (VI), упаривали. Выход 275 мг (78%).  $^1\text{H}$ -ЯМР (пиридин- $d_5$ ): 8.21с (1H, H-8), 8.18с (1H, H-2), 6.66с (2H, 6-NH<sub>2</sub>), 3.68т (2H,  $J$  6, CH<sub>2</sub>Ade), 2.59т (2H,  $J$  6, CH<sub>2</sub>NH), 1.15ус (2H, NH<sub>2</sub>). Масс-спектр,  $m/z$ : 179 (MH<sup>+</sup>).

**3-(Диэтилфосфо)пропионовая кислота, калиевая соль (VIIIб).** К раствору 2.86 г (12 ммоль) соединения (VIIIб) в 2 мл EtOH при 0°C прибавляли раствор 0.74 г (13.2 ммоль) KOH в 0.8 мл воды. Через 1 ч нагревали до 20°C, через 24 ч упаривали, соупаривали с водой, остаток наносили на колонку (3 × 20 см) с LiChroprep RP-18, элюировали водой. Фракции, содержащие продукт (VIIIб), упаривали. Выход 2.47 г (83%).  $^1\text{H}$ -ЯМР (D<sub>2</sub>O):

4.03дт (4H,  $J$  7 и 7, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.80 - 2.46м (4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1.25т (6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**9-[2-(Фосфометилкарбониламино)этил]аденин (IXа).** Раствор 295 мг (1.5 ммоль) кислоты (VIIIа) в смеси 3 мл воды, 3 мл DMF и 0.42 мл (3 ммоль) триэтиламина упаривали, соупаривали с DMF (3 × 10 мл), растворяли в 10 мл DMF, прибавляли 244 мг (1.5 ммоль) CDI, через 5 мин полученный раствор приливали к охлажденной до 0°C суспензии 130 мг (0.73 ммоль) соединения (VI) в 10 мл DMF. Реакционную массу перемешивали 30 мин при 20°C, приливали 5 мл воды, упаривали. Остаток соупаривали с DMF (3 × 10 мл), растворяли в 10 мл DMF, охлаждали до 0°C, прибавляли 1.5 мл (11.4 ммоль) триметилбромсилана, через 12 ч при 20°C упаривали, соупаривали с DMF (2 × 5 мл), остаток растворяли в 50 мл воды и наносили на колонку с DE-32 (3 × 10 см), колонку промывали водой, элюировали линейным градиентом концентрации гидрокарбоната аммония (0 → 0.15 М) в воде. УФ-поглощающие фракции упаривали, соупаривали с водой и спиртом. Выход 97 мг (44%).  $^1\text{H}$ -ЯМР (D<sub>2</sub>O): 8.06с и 8.01с (2H, H-8 и H-2), 4.28м (2H, CH<sub>2</sub>Ade), 3.58м (2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.57д (2H,  $J_{\text{CH}_2\text{P}}$  20.5, CH<sub>2</sub>P).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (D<sub>2</sub>O;  $\delta$ , м. д.): 14.5т,  $J_{\text{P,CH}_2}$  20.5 Гц.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (D<sub>2</sub>O;  $\delta$ , м. д.,  $J$ , Гц): 172.5с (C=O), 155.6с (C-6), 152.6с (C-2), 149.2с (C-4), 142.9с (C-8), 118.6с (C-5), 43.8с (C-Ade), 39.4с (C-NH), 38.8д (C-P,  $J_{\text{C-P}}$  116.5). Масс-спектр,  $m/z$ : 301 (MH<sup>+</sup>).

**9-[2-[(2-Фосфоэтил)карбониламино]этил]аденин (IXб).** Раствор 373 мг (1.5 ммоль) соединения (VIIIб) в 3 мл воды наносили на колонку (1 × 8 см) с дауэксом 50 в пиридиниевой форме, элюировали водой, УФ-поглощающие фракции упаривали, соупаривали с DMF (3 × 10 мл), растворяли в 10 мл DMF, прибавляли 244 мг (1.5 ммоль) CDI, через 7 мин приливали к охлажденной до 0°C суспензии 180 мг (1 ммоль) соединения (VI) в 10 мл DMF. Реакционную массу перемешивали 30 мин при 20°C, приливали 5 мл воды, упаривали. Остаток соупаривали с DMF (3 × 10 мл), растворяли в 10 мл DMF, охлаждали до 0°C, прибавляли 2 мл (15.2 ммоль) триметилбромсилана, через 12 ч упаривали, соупаривали с DMF (3 × 5 мл), выделяли так же, как соединение (IXа). Выход 150 мг (48%).  $^1\text{H}$ -ЯМР (D<sub>2</sub>O): 8.06с (1H, H-8), 7.96с (1H, H-2), 4.2м (2H, CH<sub>2</sub>Ade), 3.53м (2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.17м (2H, CH<sub>2</sub>CO), 1.52м (2H, CH<sub>2</sub>P).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (D<sub>2</sub>O): 23.6м. Масс-спектр,  $m/z$ : 315 (MH<sup>+</sup>).

**9-[2-[(β,γ-Дифосфат)фосфометилкарбониламино]этил]аденин (Ia) и 9-[2-[[2-(β,γ-дифосфат)фосфоэтил]карбониламино]этил]аденин (Iб).** Раствор 0.13 ммоль соединения (IXа) или (IXб) в 3 мл воды наносили на колонку (1 × 8 см) с

дауэксом 50 в пиридиниевой форме, элюировали водой, УФ-поглощающие фракции упаривали, прибавляли 0.1 мл трибутиламина и соупаривали с DMF (3 × 10 мл). К остатку приливали 10 мл формамида, прибавляли 150 мг (0.93 ммоль) CDI, суспензию перемешивали 24 ч при 20°C. К полученному раствору прибавляли 0.11 мл (2.8 ммоль) метанола, через 30 мин при интенсивном перемешивании добавляли по каплям 1 мл (0.5 ммоль) 0.5 М бис(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфата в DMF. Через 2 ч добавляли 70 мл воды и наносили на колонку (3 × 10 см) с DE-32, колонку промывали водой, элюировали линейным градиентом концентрации гидрокарбоната аммония (0 → 0.3 М) в воде. УФ-поглощающие фракции упаривали, соупаривали с водой и спиртом, лиофильно высушивали. Выход, %: 10 (Ia) и 7 (Iб). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр (D<sub>2</sub>O), (Ia): 8.09с (1H, Н-8), 7.98с (1H, Н-2), 4.31м (2H, CH<sub>2</sub>Ade) 3.62м (2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.65д (2H, J<sub>CH<sub>2</sub>P</sub> 20, CH<sub>2</sub>P); (Iб): 8.11с (1H, Н-8), 7.99с (1H, Н-2), 4.25м (2H, CH<sub>2</sub>Ade), 3.5м (2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.25м (2H, CH<sub>2</sub>CO), 1.61м (2H, CH<sub>2</sub>P). <sup>31</sup>P-ЯМР (D<sub>2</sub>O), (Ia): 6.9дт (P<sub>α</sub>), -6.5д (P<sub>γ</sub>), -21.3дд (P<sub>β</sub>); J<sub>P<sub>α</sub>CH<sub>2</sub></sub> 20, J<sub>P<sub>α</sub>P<sub>β</sub></sub> 23, J<sub>P<sub>β</sub>P<sub>γ</sub></sub> 20. Масс-спектр, *m/z*, (Iб): 475 (MH<sup>+</sup>), 492 (MH<sup>+</sup> + NH<sub>3</sub>).

**9-(Этоксикарбонилметил)аденин (X).** К суспензии 1.35 г (10 ммоль) аденина в 30 мл DMF при перемешивании добавляли 2 г (10 ммоль) 80% бис(триметилсилил)амида калия и выдерживали 1 ч при 20°C. Затем добавляли 5 мл (45 ммоль) этилового эфира бромуксусной кислоты и реакционную смесь перемешивали 8 ч при 20°C. Упаривали, остаток промывали гексаном и перекристаллизовывали из воды. Выход 1.24 г (56%), т. пл. 221°C. <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 8.18с (1H, Н-8), 8.15с (1H, Н-2), 7.35с (2H, NH<sub>2</sub>), 5.10с (2H, CH<sub>2</sub>), 4.25к (2H, J 7, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.21т (3H, J 7, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Масс-спектр, *m/z*: 222 (MH<sup>+</sup>).

**6-N-Бензоил-9-(карбоксиметил)аденин (XI).** Соупаривали 0.3 г (1.36 ммоль) соединения (X) с пиридином (2 × 20 мл), приливали 20 мл пиридина, полученную суспензию обрабатывали 0.16 мл (1.4 моль) бензоилхлорида. Реакционную смесь выдерживали 3 ч при 20°C и 1 ч при 50°C, упаривали, остаток обрабатывали 20 мин 5 мл 2 М КОН/EtOH-H<sub>2</sub>O (1 : 1), нейтрализовали 1 М HCl. Выпавший осадок, представлявший собой соединение (XI), отфильтровывали. Выход 0.42 г (82%). <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 8.56с (1H, Н-8), 8.25с (1H, Н-2), 7.79м (2H, *m*-Bz), 7.48м (3H, *o*-, *n*-Bz), 4.85с (2H, CH<sub>2</sub>Ade). Масс-спектр, *m/z*: 298 (MH<sup>+</sup>).

**Диэтиловый эфир 2-азидоэтилфосфоновой кислоты (XII).** К раствору 20 г (82 ммоль) диэтилового эфира (XII) в 100 мл DMF добавляли 10 мл абс. CH<sub>3</sub>CN и 6 г (92 ммоль) NaN<sub>3</sub>. Реакционную

смесь кипятили 7 ч, упаривали, соупаривали 2 раза с толуолом. Остаток фильтровали через слой силикагеля (высота 2 см) в системе CHCl<sub>3</sub>-EtOH, 20 : 1. Выход 16 г (94%). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 4.00дк (4H, J 8 и 7, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.46дк (2H, J 7 и 7, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.05дт (2H, J 18 и 7, CH<sub>2</sub>P), 1.25т (6H, J 7, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Масс-спектр, *m/z*: 208 (MH<sup>+</sup>).

**Диэтиловый эфир 2-аминоэтилфосфоновой кислоты (XIV).** К раствору 8 г (39 ммоль) соединения (XIII) в 100 мл EtOH добавляли 10 мг Pd/C. В реакционную смесь в течение 24 ч пропускали водород, затем смесь отфильтровывали и упаривали. Выход 5.0 г (71%). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3.97м (4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.0м (4H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 1.85дт (2H, J 17 и 7, CH<sub>2</sub>P), 1.25т (6H, J 7, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Масс-спектр, *m/z*: 182 (MH<sup>+</sup>).

**6-N-Бензоил-9-[[2-(диэтилфосфоно)этил]аминокарбонилметил]аденин (XV).** К суспензии 80 мг (0.24 ммоль) соединения (XI) в 5 мл DMF прибавляли 60 мг (0.37 ммоль) CDI. Через 1 ч прибавляли 0.2 г (0.58 ммоль) соединения (XIV), через 24 ч добавляли 1 мл воды, упаривали при 20°C и остаток наносили на колонку (2 × 10 см) с силикагелем. Продукт элюировали системой *i*PrOH-хлороформ (1 : 4). Выход 65 мг (54%). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 9.1м (2H, NHBz + NHC(O)), 8.07с (1H, Н-2), 8.56с (1H, Н-8), 7.90м (2H, *m*-Bz), 7.45м (3H, *o*-, *n*-Bz), 4.91с (2H, CH<sub>2</sub>Ade), 4.02м (4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.50м (2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.0дт (2H, J 19 и 7, CH<sub>2</sub>P), 1.25т (6H, J 7, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Масс-спектр, *m/z*: 461 (MH<sup>+</sup>).

**9-[[2-(Фосфоноэтил)аминокарбонилметил]аденин (XVI).** К раствору 40 мг (0.08 ммоль) соединения (XV) в 1 мл DMF при охлаждении до -5°C прибавляли 0.1 мл (0.76 ммоль) Me<sub>3</sub>SiBr. Реакционную смесь выдерживали 20 ч при -5°C, упаривали, остаток обрабатывали 2 мл 25% водного аммиака. Раствор выдерживали 50 ч при 20°C, упаривали, наносили на колонку (2 × 20 см) с LiChroprep RP-18, элюировали водой. Выход 21 мг (84%). <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 7.98с (1H, Н-8), 7.91с (1H, Н-2), 4.82с (2H, CH<sub>2</sub>Ade), 3.26м (2H, CH<sub>2</sub>NH), 1.67дт (2H, J 19 и 7, CH<sub>2</sub>P). <sup>31</sup>P-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 21.5м. Масс-спектр, *m/z*: 301 (MH<sup>+</sup>).

**9-[[2-(β,γ-Дифосфат)фосфоэтил]аминокарбонилметил]аденин (II).** Растворили 21 мг (0.07 ммоль) соединения (XVI) в 2 мл воды и переводили в пиридиниевую соль как описано для (Ia). После упаривания прибавляли 0.1 мл трибутиламина, соупаривали с DMF (3 × 10 мл), растворяли в 10 мл диметилсульфоксида и прибавляли 113 мг (0.7 ммоль) CDI, перемешивали 36 ч при 20°C. К полученному раствору прибавляли 0.1 мл (2.5 ммоль) метанола, через 30 мин при интенсивном перемешивании добавляли по каплям 1 мл

(0.5 ммоль) 0.5 М бис(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфата в DMF. Через 2 ч добавляли 70 мл воды, (II) выделяли так же, как (Ia). Выход 3 мг (9%). <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O): 7.96с (1H, H-8), 7.89с (1H, H-2), 4.8с (2H, CH<sub>2</sub>Ade), 3.3м (2H, CH<sub>2</sub>NH), 1.72м (2H, CH<sub>2</sub>P). Масс-спектр, *m/z*: 461 (MH<sup>+</sup>), 478 (MH<sup>+</sup> + NH<sub>3</sub>).

**Эксперименты в бесклеточных системах.** ДНК фага M13mp10 (плюс-цепь) выделяли из культуральной жидкости *E. coli* XL-1 как описано в работе [15]. Использовали следующие ферменты: ОТ ВИЧ (любезно предоставленную Т.А. Розовской, ВКНЦ РАМН), ОТ ВМП (Омутнинский хим. завод), ДНК-полимеразу α из плаценты человека, выделенную Д.Ю. Мозжериним и соавт. [16], ДНК-полимеразу β из тимуса теленка, выделенную Г.А. Невинским и соавт. [17], фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli* фирмы Amersham (UK) и TdT из тимуса теленка (Amersham). Тетрадезоксинуклеотид (синтезированный Б.К. Черновым, ИМБ РАН) метили по 5'-положению изотопом <sup>32</sup>P и гибридизовали с матрицей как описано в [18]. Реакции элонгации праймера, катализируемые перечисленными ферментами, проводили в условиях [15]. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ.

Авторы выражают благодарность Н.Б. Тарусовой (ИМБ РАН, Москва) за консультативную помощь при выполнении синтеза. Работа финансировалась из гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 93-04-20542 и гранта программы "Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении. Вирусология", № 508.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Clercq E., Sakuma T., Baba M., Pauwels R., Balzarini J., Rosenberg I., Holý A. // *Antiviral Res.* 1987. V. 8. P. 261 - 272.
2. Balzarini J., Naesens L., Herdewijn P., Rosenberg I., Holý I., Pauwels R., Baba M., Johns D.G., De Clercq E. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 2. P. 332 - 336.
3. Kim C.U., Yu Luh B., Misco P.F., Bronson J.J., Hitchcock M.J.M., Ghazzouli I., Martin J.C. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. № 4. P. 1207 - 1213.
4. Kim C.U., Misco P.F., Yu Luh B., Hitchcock M.J.M., Ghazzouli I., Martin J.C. // *J. Med. Chem.* 1991. V. 34. № 7. P. 2286 - 2294.
5. Harnden R.M., Parkin A., Parratt J.M., Perkins R.M. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. № 10. P. 1343 - 1355.
6. Куханова М.К., Кузнецова Е.В., Краевский А.А., О'Хара Б., Беккер Дж., Морин Дж., Глузман Я. // *Молекулярн. биология.* 1994. Т. 28. № 3. С. 530 - 541.
7. Михайлов С.Н., Ефимцева Е.В., Фомичева М.В., Родионов М.С., Керн Е.П. // *Биоорганич. химия.* 1995. Т. 21. № 2. С. 130 - 132.
8. Krayevsky A.A., Watanabe K.A. // *Nucleosides and Nucleotides.* 1993. V. 12. № 6. P. 649 - 670.
9. Мицнер Б.И., Кочеткова М.Б., Филиппов Д.В., Цытович А.В., Дяткина Н.Б. // *Молекулярн. биология.* 1993. Т. 27. № 1. С. 174 - 184.
10. Baraf A.R., Bodner A.J., Ting R.C.Y., Cheng Y.-C. // *J. Virol.* 1989. V. 63. № 3. P. 1400 - 1403.
11. Jie L., Van Aerschot A., Balzarini J., Janssen G., Busson R., Hoogmartens J., De Clercq E., Herdewijn P. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. № 9. P. 2481 - 2487.
12. Garner A.Y., Chapin E.C., Scanlon P.M. // *J. Org. Chem.* 1959. V. 24. № 4. P. 532 - 536.
13. Cooke M.P., Biciunas K.P. // *Synthesis.* 1981. № 4. P. 283 - 285.
14. Ludwig L., Eckstein F. // *J. Org. Chem.* 1989. V. 54. № 3. P. 631 - 635.
15. Chidgeavadze Z.G., Beabealashvili R.Sh., Krayevsky A.A., Kukhanova M.K. // *Biochim. et biophys. acta.* 1986. V. 868. № 2. P. 145 - 152.
16. Мозжерин Д.Ю., Атражев А.М., Куханова М.К. // *Молекулярн. биология.* 1992. Т. 26. № 5. С. 999 - 1010.
17. Колочева Т.И., Невинский Г.А. // *Молекулярн. биология.* 1993. Т. 27. № 6. С. 1368 - 1379.
18. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. // *Molecular Cloning: Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

## Synthesis and Biochemical Properties of Phosphonyl Acyclic Analogs of 2'-Deoxyadenosine Nucleotides

D. V. Malakhov, D. G. Semizarov, and M. V. Yas'ko

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

**Abstract** — 9-[2-(phosphonomethyl)carbonylamino]ethyl]adenine, 9-[(2-phosphonoethyl)aminocarbonylmethyl]adenine, 9-[2-[(2-phosphonoethyl)carbonylamino]ethyl]adenine, and their diphosphates were synthesized. All three diphosphates were shown to incorporate into the 3'-terminus of the DNA chain during the synthesis of the avian myeloblastose virus catalyzed by reverse transcriptase. However, they do not serve as substrates for DNA polymerase α from human placenta, polymerase β from calf thymus, or terminal deoxynucleotidyl transferase from calf thymus.

**Key words:** nucleosides; nucleotides, analogs.