



УДК 577.152.277.153

СИНТЕЗ И СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ, МОДЕЛИРУЮЩИХ dATP В РЕАКЦИЯХ СИНТЕЗА ДНК, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ

© 2001 г. Ю. А. Шаркин^{*,#}, Д. Г. Семизаров^{*}, Л. С. Викторова^{*,**}, М. К. Куханова^{*}

^{*} Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

^{**} Московский центр медицинских исследований Университета Осло,
119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 06.12.2000 г. Принята к печати 29.03.2001 г.

Синтезирован ряд модифицированных нуклеозид-5'-трифосфатов, содержащих в качестве агликона производные пиримидина, имитирующие аденин. Изучение субстратных свойств этих соединений по отношению к ряду ДНК-синтезирующих ферментов показало их способность встраиваться в растущую цепь ДНК вместо dATP.

Ключевые слова: ДНК-полимеразы; модифицированные нуклеотиды; аналоги аденина; пиримидин; карбоцикл.

ВВЕДЕНИЕ

Модификация гетероциклического основания в молекулах dNTP – один из методов получения аналогов природных соединений, используемых для субстратно-ингибиторного анализа ДНК-синтезирующих ферментов. Известные модификации пуриновых оснований dNTP условно можно разделить на два типа: затрагивающие и не затрагивающие атомы, участвующие в образовании уотсон-криковских пар. В обоих случаях средство полученных соединений к ДНК-синтезирующим ферментам могло как полностью исчезать, так и оставаться довольно высоким по сравнению с природными субстратами. Так, было показано, что 1,N⁶-этен-2'-дезоксаденозин-5'-трифосфат (ε-dATP) может имитировать, хотя и неэффективно, dATP в реакции удлинения праймера, катализируемой фрагментом Кленова, несмотря на то, что этеновый мостик препятствует образованию уотсон-криковской пары с основанием остатка dTMP матрицы [1]. Кроме того, этот аналог встраивается в растущую цепь ДНК в присутствии фрагмента Кленова так-

же и вместо dCMP и dGMP, проявляя тем самым неоднозначные комплементарные свойства.

Производные 7-дезазапурин-2',3'-дидезоксирибозид-5'-трифосфатов, в 7-положение которых введен заместитель, несущий флуоресцентную группу, встраиваются в ДНК в присутствии обратной транскриптазы AMV и ДНК-полимеразы T7 так же эффективно, как соответствующие dd-NTP [2]. Соединения этого типа проявили себя хорошими субстратными терминаторами для концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы [3]. Соответствующие аналоги dNTP встраиваются ДНК-полимеразами *Thermococcus litoralis* и *Thermus aquaticus*, после чего возможна дальнейшая элонгация цепи ДНК [4].

Также известны аналоги dNTP, которые вместо нуклеиновых оснований содержат гидрофобные ароматические циклы различных типов. Несмотря на то что эти циклы не способны к образованию водородных связей, трифосфаты, содержащие такого рода агликоны, оказались хорошими субстратами для фрагмента Кленова. Примером подобной модификации являются соответствующие производные изокарбонилстирила [5], которые встраиваются напротив любого из четырех оснований матрицы с достаточно высокой и почти одинаковой эффективностью, после чего элонгация цепи ДНК терминируется.

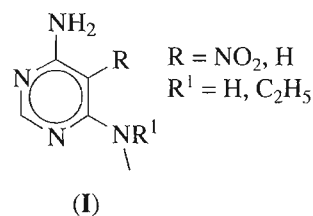
Таким образом, субстратами ДНК-синтезирующих ферментов могут быть аналоги dNTP с

Сокращения: ddNTP – 2',3'-дидезоксинуклеозид 5'-трифосфаты; CDI – N,N'-карбонилдиимидазол; фрагмент Кленова – фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli*; Taq – *Thermus aquaticus*; AMV – вирус миелобластома птиц; HIV – вирус иммунодефицита человека.

[#] Автор для переписки (эл. почта: chetov@imb.ac.ru; тел.: (095) 135-60-65).

различными модифицированными основаниями (см. также [6]). Однако для того, чтобы остаток нуклеотида включался в растущую цепь комплементарно только (или хотя бы предпочтительно) одному матричному основанию, молекула аналога должна содержать атомы, способствующие однозначному образованию водородных связей при взаимодействии с праймер-матричным комплексом.

В данной работе мы изучили способность dNTP, содержащих в качестве оснований пириимидины типа (I), служить субстратами некоторых ДНК-синтезирующих ферментов. Заместители в пириимидиновом кольце аналогов dNTP были подобраны таким образом, чтобы гетероциклический фрагмент молекул имитировал аденин. Мы предположили, что основание общего вида (I) может заменить природное пуриновое основание, так как имидазольная часть молекулы аденина не участвует в образовании водородных связей в уотсон-криковских парах, и такая модификация практически не влияет на геометрию углевод-фосфатной части нуклеотида.

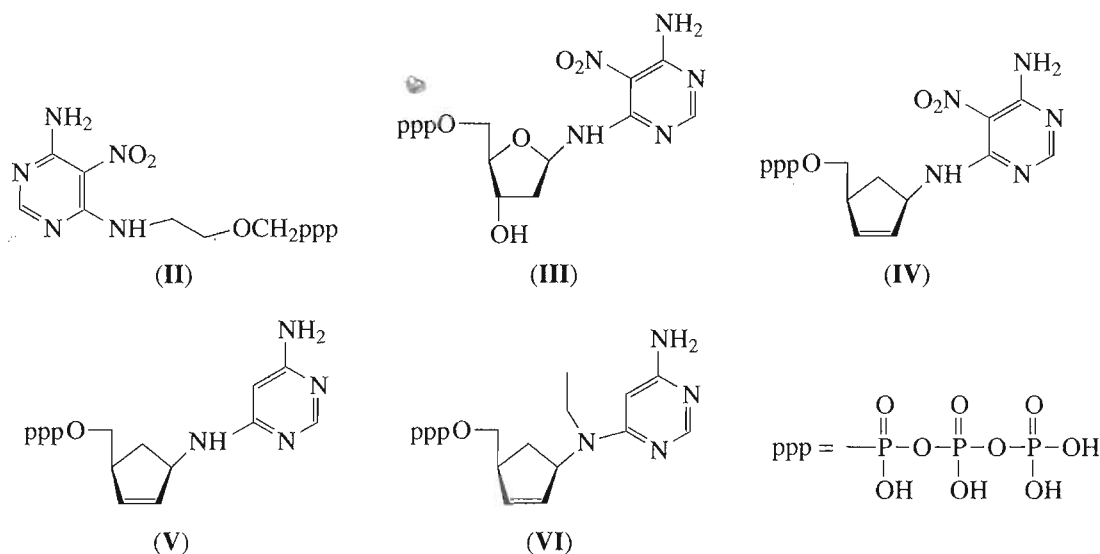


Нас интересовало, насколько эффективно и комплементарно какому матричному остатку будет происходить катализируемое ДНК-полимеразами встраивание таких аналогов в растущую цепь ДНК. Кроме того, синтез и изучение субстратных свойств нуклеотидов с адениноподобными основаниями важны для создания на их основе аналогов dNTP, содержащих репортерные группы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез аналогов dATP с раскрытым имидазольным циклом

Используя в качестве агликонов пириимидины (I), мы синтезировали набор неизвестных ранее аналогов dATP (II)–(VI).



Первым из соединений был синтезирован аналог (II) дифосфата 9-(2-фосфонометоксиэтил)аденина (P_2 РМЕА) [7], имеющий раскрытый имидазольный цикл (схема 1), поскольку P_2 РМЕА является хорошим терминаторным субстратом обратных транскриптаз HIV и AMV.

Взаимодействием 4,6-дихлор-5-нитропириимидина (VII) с этаноламином и последующей обработкой полученного соединения (VIII) метанолом, насыщенным аммиаком, был получен аминопиримидин (IX). Последний конденсировали с этиловым эфиром тозилксиметилфосфоновой кислоты, что приводило к фосфонату (X), который

превращали в фосфоновую кислоту (XI) обработкой триметилбромсиланом. Соединение (XI) было описано ранее, хотя подробности синтеза и физико-химические характеристики приведены не были [8]. Аналогичное производное 9-(2-фосфонометоксиэтил)гуанина (РМЕГ) было получено ранее [9] с использованием другой стратегии синтеза.

Целевой фосфонодифосфат (II) был получен из фосфоновой кислоты (XI) с использованием CDI и бис(три-*n*-бутиламмониевой) соли пирофосфорной кислоты.

Поскольку субстратные свойства соединения (II) по отношению к фрагменту Кленова и обрат-

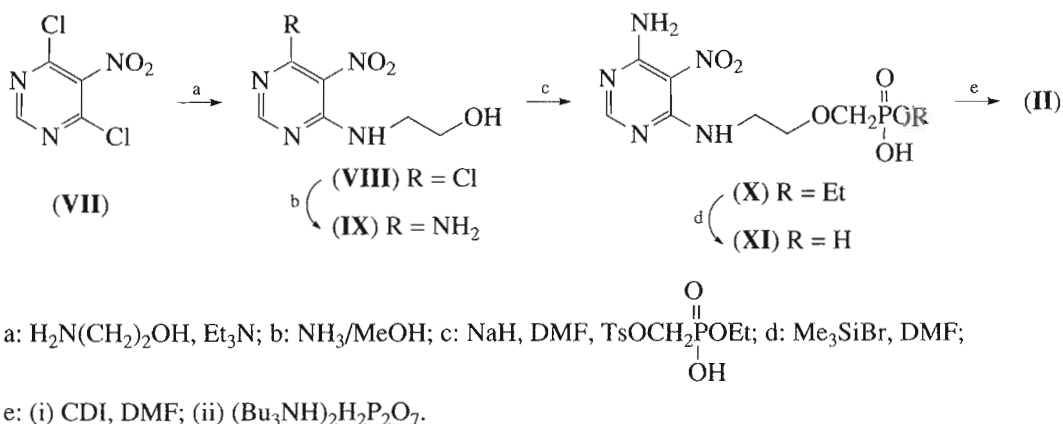


Схема 1.

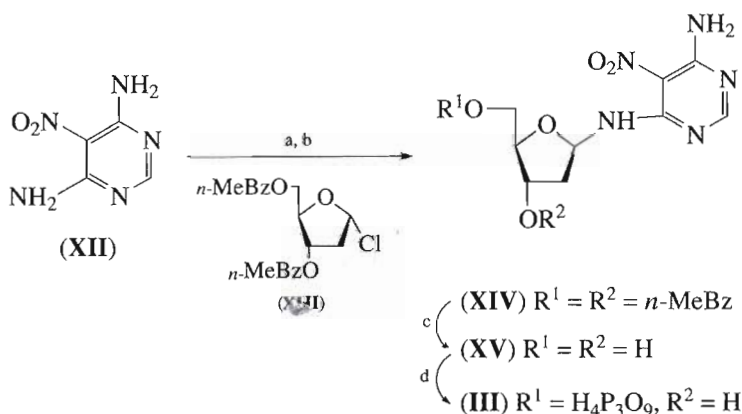
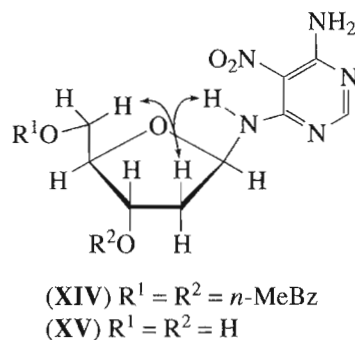


Схема 2.

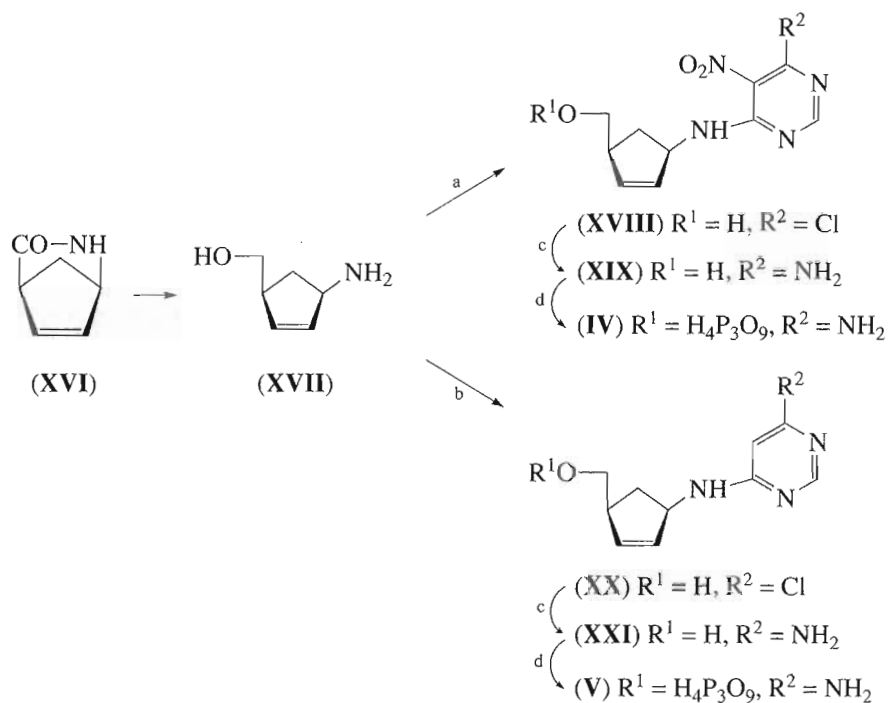
ной транскриптазе AMV оказались близки к таковым для природных нуклеотидов (см. следующий раздел), мы решили синтезировать нуклеотид (III) (схема 2), содержащий то же основание и дезоксирибозу в качестве углеводного остатка.

Группой Робинса в 1988 г. [10] был синтезирован природный нуклеозид клитоцин (clitocine), выделенный ранее из гриба *Clitocybe inversa*. Поскольку строение клитоцина отличается от структуры целевого нуклеозида (XV) только отсутствием 2'-гидроксила, синтез (XV) был осуществлен на основе опубликованного для клитоцина метода. Пиримидин (XII) силилировали обработкой *N,O*-бис(триметилсилил)ацетамидом, а затем конденсировали с 3,5-ди-*O*-толуоил- α -хлор-2-дезоксирибозой (XIII) в присутствии SnCl_4 , после чего хроматографией на силикагеле был выделен основной продукт реакции – нуклеозид (XIV). Деблокирование последнего метилатом натрия дало целевой нуклеозид (XV), который далее фосфорилировали по методу

Людвига [11], что приводило к искомому нуклеотиду (III). Природная β -конфигурация аномерных центров нуклеозидов (XIV) и (XV) подтверждается наличием ядерного эффекта Оверхаузера для протонов, указанных стрелками:

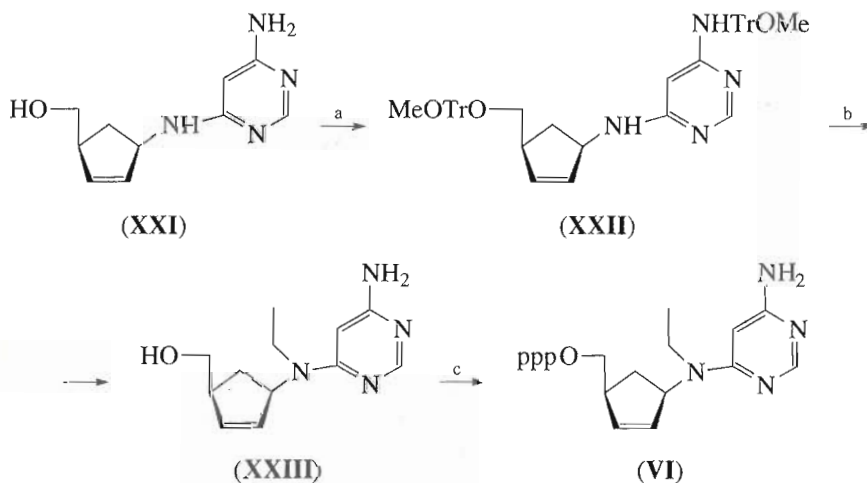


Соединение (III) проявляет свойства субстрата для всех исследованных ферментов при сравни-



a: (VII), $(Pr^i)_2EtN$; b: 4,6-дихлорпиримидин, $(Pr^i)_2EtN$; c: $NH_3/MeOH$;
 d: (i) 1,2,4-триазол, $POCl_3, MeCN$; (ii) $(Bu_3NH)_2H_2P_2O_7, DMF$.

Схема 3.



a: $MeOTrCl, Et_3N$; b: (i) NaN, EtI ; (ii) 80% $AcOH$;
 c: (i) 1,2,4-триазол, $POCl_3, MeCN$; (ii) $(Bu_3NH)_2H_2P_2O_7, DMF$.

Схема 4.

тельно невысоких концентрациях и способно включаться в растущую цепь ДНК (в том числе неоднократно) только вместо dAMP (см. следующий раздел). Это позволило бы использовать его в качестве базовой структуры для синтеза соответствующих аналогов, содержащих репортер-

ные группы, если бы не высокая лабильность гликозидной связи, что затрудняет синтез производных нуклеотида (III).

Для повышения стабильности соединений, содержащих раскрытый имидазольный цикл аденинового основания, мы заменили дезоксирибоз-

ный остаток на производное циклопентена, поскольку сходный гуанинсодержащий нуклеотид (трифосфат карбовира) является хорошим терминаторным субстратом ряда ДНК-синтезирующих ферментов [12]. Нами были синтезированы трифосфаты с аденинподобными пиримидиновыми основаниями (IV) и (V) (схема 3).

Амин (XVII), приготовленный из карбоциклического лактама (XVI) [13], конденсировали с соответствующими пиримидинами, и полученные соединения (XVIII) и (XX) превращали обработкой аммиаком в нуклеозиды (XIX) и (XXI), соответственно. Последние фосфорилировали последовательно трис(триазолид)фосфатом и бис(три-*n*-бутиламмониевой) солью пирофосфорной кислоты, что приводило к целевым нуклеотидам (IV) и (V).

Последним в ряду аналогов dATP с раскрытым имидазольным циклом был синтезирован трифосфат (VI), в котором по аминогруппе, соединяющей карбоциклический и пиримидиновый остатки, был введен этильный радикал (схема 4). Данная модификация была осуществлена для того,

чтобы выяснить, сохранит ли после этого производное нуклеозид-5'-трифосфата (V) свои субстратные свойства и, следовательно, возможно ли введение в данное положение нуклеотида линкера, содержащего репортерную группу.

Натриевую соль защищенного нуклеозида (XXII) алкилировали йодистым этилом, удаляли защитные группы и целевой нуклеозид (XXIII) фосфорилировали до трифосфата (VI) аналогично получению трифосфатов (IV) и (V).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ АНАЛОГОВ dATP С РАСКРЫТЫМ ИМИДАЗОЛЬНЫМ ЦИКЛОМ

Модифицированные dNTP (II)–(VI) были изучены как субстраты ДНК-синтезирующих ферментов: ДНК-полимеразы *Taq*, фрагмента Кленова и обратной транскриптазы AMV с использованием следующих праймер-матричных комплексов:

комплекс А

(3') GGG TCA GTG CTG CAA CAT TTT GCT GCC GGT ...ДНК фага M13mp10
[5'-³²P]p CCC AGT CAC GAC GT

комплекс Б

(3') GGG TCA GTG CTG CAA CAT TTT GCT GCC GGT CAC ...ДНК фага M13mp10
[5'-³²P]p GAC GTT GTA AAA CG

Результаты ферментативных реакций (рис. 1а, 1б) показывают, что нуклеотидный аналог (III) не включается в растущую цепь ДНК при катализе ДНК-полимеразой *Taq* ни вместо dTMP (дорожки 4–6, рис. 1а), ни вместо dCMP (дорожки 9–11, рис. 1б). Когда остаток dTMP был включен в цепь ДНК в первое положение после праймера, дальнейшей элонгации праймера в присутствии соединения (III) не наблюдалось, что свидетельствует о невозможности его включения в ДНК также и вместо dGTP (дорожки 7–9, рис. 1а). В то же время аналог (III) элонгировал праймер, когда следующим нуклеотидным остатком, комплементарным матрице, должен быть dAMP (дорожки 4–6, рис. 1б). Следует особо отметить, что после включения аналога (III) наблюдалась элонгация праймера природными dNTP (дорожки 7–8, рис. 1б).

Соединения (II), (IV) и (V) не являлись субстратами ДНК-полимеразы *Taq* (данные не приводятся). Однако, как видно из сравнения дорожек 5–10 с контрольными дорожками 3 и 4 (рис. 2), соединения (II), (IV) и (V) удлиняют праймер в комплексе А на один шаг, включаясь вместо dATP, если в качестве ДНК-синтезирующего фермента был взят фрагмент Кленова (дополнительная верхняя полоса на дорожке 3 соответствует не-

специфическому включению нуклеотидного остатка). Дальнейшей элонгации праймера не наблюдается, если следующими нуклеотидными остатками матрицы (комплекс А) являются три остатка dTMP. Таким образом, указанные соединения способны включаться в цепь ДНК фрагментом Кленова вместо dATP только один раз, выступая в качестве терминаторных субстратов этого фермента. Сродство соединений (II), (IV) и (V) к ферменту довольно высоко, что иллюстрируется полной утилизацией праймер-матричного комплекса при концентрации аналогов 2 мкМ. В отличие от соединений (II), (IV) и (V), аналог (III) способен включаться в цепь ДНК несколько раз, даже в том случае, когда удлиняющемуся участку праймера соответствует тетраимидиловый участок матрицы (дорожки 11–12, рис. 2).

Соединения (II)–(V) являются хорошими субстратами обратной транскриптазы AMV. Как видно из рис. 3, практически полная утилизация праймера в комплексе Б наблюдается при концентрации аналогов 2 мкМ. Таким образом, соединения (II)–(V) элонгируют праймер комплементарно тимидиновому остатку, имитируя остаток адениловой кислоты.

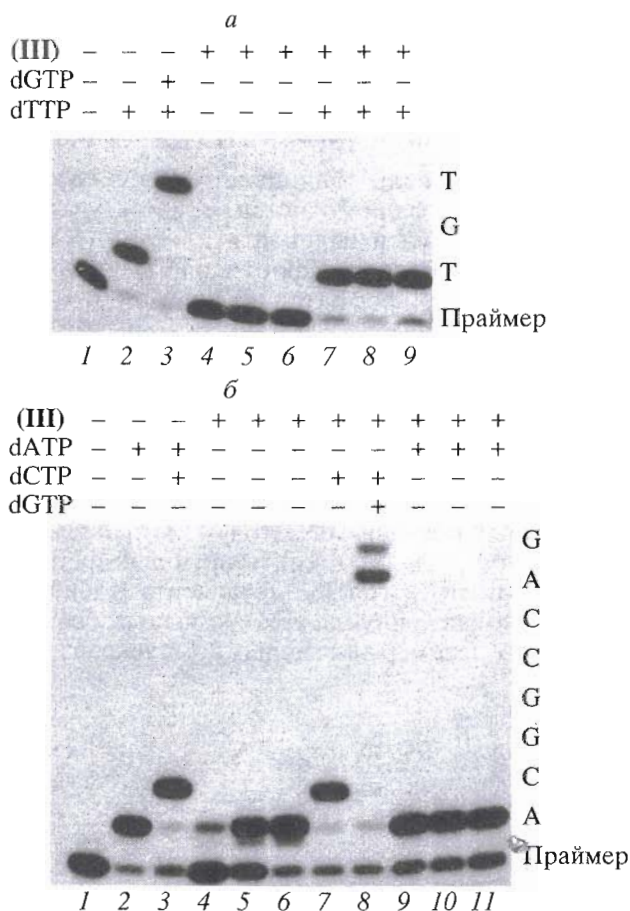


Рис. 1. Субстратные свойства аналога (III) в реакциях, катализируемых ДНК-полимеразой *Taq*. Анализ реакционных смесей электрофорезом в 15% ПААГ. а – Праймер-матричный комплекс А. Концентрации: dTTP и dGTP по 2 мкМ; (III) – 2 (4, 7), 20 (5, 8) и 200 мкМ (6, 9). Реакционные смеси (7)–(9) были преинкубированы 10 мин при 74°C перед добавлением (III). б – Комплекс Б. Концентрации: dATP, dCTP и dGTP по 2 мкМ; (III) – 2 (4, 9), 20 (5, 10) и 200 мкМ (6, 7, 8, 11). Реакционные смеси (9)–(11) были преинкубированы 10 мин при 74°C перед добавлением (III).

Соединение (VI) не проявило субстратных свойств по отношению к фрагменту Кленова и обратной транскриптазе AMV (данные не приводятся).

Таким образом, отсутствие имидазольного цикла в dNTP с аденинподобным агликоном не нарушает их субстратных свойств по отношению к некоторым ДНК-полимеразам, сохраняя при этом специфичность их включения в цепь комплементарно тимидиновому остатку матрицы. Полученные результаты открывают новые возможности дальнейшей модификации основания, имитирующего аденин, в подобных нуклеотидах по 5-положению пиримидина с целью введения в них репортерных групп.

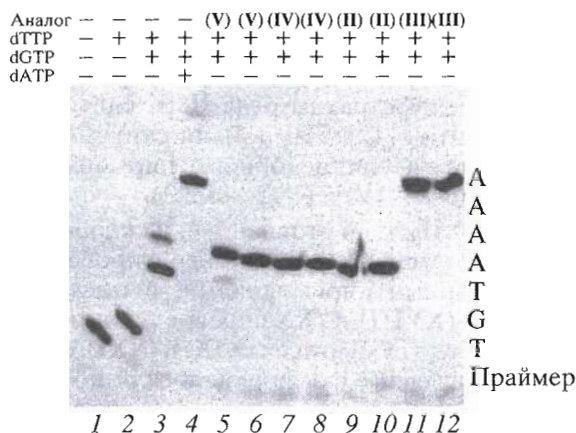


Рис. 2. Субстратные свойства аналогов (II)–(V) в реакциях, катализируемых фрагментом Кленова. Анализ реакционных смесей электрофорезом в 15% ПААГ. Праймер-матричный комплекс А. Концентрации dTTP, dATP и dGTP по 10 мкМ; (V) – 2 (5) и 20 мкМ (6); (IV) – 2 (7) и 20 мкМ (8); (II) – 2 (9) и 20 мкМ (10); (III) – 2 (11) и 20 мкМ (12).

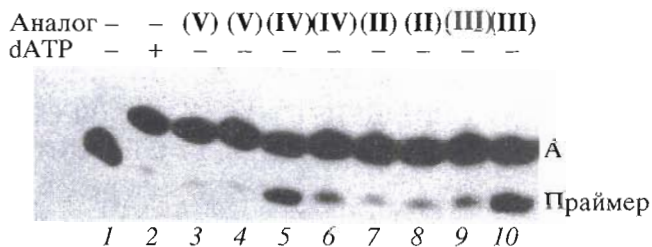


Рис. 3. Субстратные свойства аналогов (II)–(V) в реакциях, катализируемых обратной транскриптазой AMV. Анализ реакционных смесей электрофорезом в 15% ПААГ. Праймер-матричный комплекс Б. Концентрации: dATP 2 мкМ (2); (V) – 2 (3) и 20 мкМ (4); (IV) – 2 (5) и 20 мкМ (6); (II) – 2 (7) и 20 мкМ (8); (III) – 2 (10) и 20 мкМ (9).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

^1H -ЯМР- (200 МГц, внутренний стандарт – $\text{Bu}'\text{OH}$) и ^{31}P -ЯМР-спектры (81 МГц, внешний стандарт – 85% H_3PO_4) регистрировали на спектрометре Bruker WP-200 SY (США). ^1H -ЯМР-спектры (500 МГц) для соединений (XIV) и (XV) сняты на спектрометре Bruker WM-500 (США). Масс-спектры в режиме FAB выполнены на спектрометре Kratos MS 50TC (Япония), образцы смешивали с глицирином. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord M40 (Германия). Для колоночной хроматографии использовали 650 M DEAE-Toyopearl (Toyosoda, Япония), LiChroprep RP-8 (25–40 мкм) и RP-18 (25–40 мкм) (Merck, Германия), Dowex 50 WX8 (Serva, Германия) и силика-

гель Kieselgel 60 (63–100 мкм, Merck). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). В работе использованы 4,6-дихлор-5-нитропиримидин и 4,6-дихлорпиримидин (Aldrich, США). Этиловый эфир тозилоксиметилфосфоновой кислоты получен как описано в работе [14]. Трис(триазолид)фосфат был получен аналогично трис(имидазолид)фосфату [15].

Использовались следующие ферменты: обратная транскриптаза AMV (КФ 2.7.7.49; Омутнинский химический завод); ДНК-полимераза I из *E. coli* (фрагмент Кленова) (КФ 2.7.7.7; Amersham, Великобритания), ДНК-полимераза *Taq* (КФ 2.7.7.7; Promega, США). Односпиральная ДНК фага M13 mp10 (плюс-цепь) получена из культуральной среды реципиентного штамма *E. coli* K12XL1 [16]. Тетрадекануклеотидные праймеры фосфорилировали по 5'-положению T4-полинуклеотидкиназой (КФ 2.7.4.4; Promega) с помощью [γ -³²P]АТР (удельная активность 3000 Ки/ммоль). После образования комплексов между праймерами и ДНК фага M13, они были очищены на колонке с BioGel A-1.5m и использованы для изучения субстратных свойств синтезированных соединений.

Реакционные смеси для испытания субстратных свойств содержали в объеме 6 мкл 10 мМ Трис-НСI-буфер (рН 7.9), 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит (для фрагмента Кленова), 50 мМ Трис-НСI (рН 9.0), 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ (для ДНК-полимеразы *Taq*); 20 мМ Трис-НСI (рН 8.2), 40 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит (для обратной транскриптазы AMV); 10 нМ праймер-матричный комплекс, фермент (2 ед. акт. обратной транскриптазы AMV; 0.5 ед. акт. ДНК-полимеразы *Taq*; 0.2 ед. акт. фрагмента Кленова) и исследуемые dNTP (II)–(V) в различных концентрациях (см. подписи к рисункам). Реакции проводили в течение 30 мин при 20°C (с фрагментом Кленова), при 37°C (с обратной транскриптазой AMV) и 10 мин при 74°C (с ДНК-полимеразой *Taq*). Реакции останавливали добавлением деионизованного формамида, содержащего 0.5 мМ EDTA и 0.1% ксиленианол и бромфенолового синий. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 15% денатурирующем ПААГ и автордиографировали с использованием рентгеновской пленки Kodak RX.

4-Гидроксиэтиламино-6-амино-5-нитропиримидин (IX). К охлажденной до 0°C суспензии 180 мг (0.93 ммоль) 4,6-дихлор-5-нитропиримидина (VII) в 5 мл метанола добавляли по каплям 57 мг (0.93 ммоль) этаноламина в 3 мл метанола и перемешивали 30 мин при 0°C. Затем добавляли 138 мкл (1 ммоль) Et₃N и оставляли при 20°C. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 5 мл хлороформа, нерастворившийся осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали и остаток растворяли в 5 мл метанола. К полученному раствору

прибавляли 3 мл метанола, насыщенного аммиаком при 0°C. Реакционную смесь оставляли на ночь, выпавший осадок отфильтровывали и пиримидин (IX) выделяли хроматографией на силикагеле, элюируя смесью CHCl₃–MeOH, 4 : 1. Выход 83.3 мг (45%). УФ (MeOH): λ_{\max} 335 нм, λ_{\min} 277 нм. ¹H-ЯМР (δ , м. д., DMSO-*d*₆): 9.13 шс (1H, NH), 8.17 шс (2H, NH₂), 7.83 с (1H, H₂), 4.76 шс (1H, OH), 3.5 м (4H, CH₂–CH₂). Масс-спектр, *m/z*: (M + 1)⁺ 200.2.

Этиловый эфир 4-фосфометоксиэтиламино-6-амино-5-нитропиримидина (X). К раствору 65 мг (0.326 ммоль) соединения (IX) и 106 мг (0.36 ммоль) моноэтилового эфира *n*-толуолсульфонил-оксиметилфосфоновой кислоты в 5 мл DMF добавляли 78 мг (2.6 ммоль) 80% суспензии NaN в масле и перемешивали 18 ч при 20°C. Затем добавляли H₂O, нейтрализовали 0.1 М HCl до рН 6, упаривали и эфир (X) выделяли обращенно-фазовой хроматографией на колонке с LiChroprep RP-18, элюируя H₂O, а затем смесью MeOH–H₂O, 1 : 9. Выход 61 мг (58%). УФ (MeOH): λ_{\max} 335 нм, λ_{\min} 277 нм. Масс-спектр, *m/z*: (M + 1)⁺ 323.4. ¹H-ЯМР (δ , м. д., D₂O): 7.71 с (1H, H₂), 3.6–3.75 м (2H, –OCH₂CH₃), 3.5–3.6 м (6H, –CH₂CH₂– и –OCH₂P–), 1.08 т (3H, J 7 Гц, CH₃).

4-Фосфометоксиэтиламино-6-амино-5-нитропиримидин (XI). Раствор 60 мг (19 ммоль) моноэтилового эфира фосфоната (X) в 2 мл DMF охлаждали до 0°C, добавляли триметилбромсилан (2 × 0.1 мл) и оставляли на 18 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали досуха, затем с H₂O (3 × 5 мл) и фосфонат (XI) выделяли обращенно-фазовой хроматографией на колонке с LiChroprep RP-18, элюируя H₂O. Выход 52.3 мг (96%). УФ (H₂O): λ_{\max} 342 нм (ϵ 10000), λ_{\min} 265 нм. Масс-спектр, *m/z*: (M + 1)⁺ 294.18. ¹H-ЯМР (δ , м. д., D₂O): 7.75 с (1H, H₂), 3.55–3.7 м (4H, –CH₂CH₂–), 3.51 д (2H, J 8.5 Гц, CH₂–P).

4-Дифосфосфосфометоксиэтиламино-6-амино-5-нитропиримидин (II). Раствор 22 мг (0.075 ммоль) фосфоната (XI) в 2 мл воды наносили на колонку Dowex 50 (0.5 × 5 см) в пиридиниевой форме, элюировали водой, УФ-поглощающие фракции упаривали, прибавляли 0.1 мл трибутиламина и переупаривали с DMF (3 × 10 мл). К остатку в 1 мл DMF добавляли 122 мг (0.75 ммоль) CDI и оставляли на 18 ч при 20°C. К смеси добавляли 0.283 мл метанола, через 1 ч добавляли 0.8 мл 0.5 М раствора бис(три-*n*-бутиламониевой) соли пиродифосфорной кислоты в абс. DMF, выдерживали 1 ч при 20°C. Реакционную смесь упаривали досуха, остаток растворяли в 50 мл воды и наносили на колонку DEAE-Toyorearl (HCO₃⁻-форма, объем 150 мл). Колонку промывали водой, элюировали линейным градиентом концентрации NH₄HCO₃ (0 → 0.35 М), фракции, содержащие продукт, упаривали досуха, затем с H₂O (5 × 20 мл), а затем дополнительно очищали обращенно-фазовой хроматографией на колонке

с LiChroprep RP-18, элюировали водой. Выход 13.5 мг (35%). УФ (H₂O): λ_{\max} 342 нм (ϵ 10000), λ_{\min} 265 нм. ¹H-ЯМР (δ , м. д., D₂O): 7.82 с (1H, H₂), 3.6–3.74 м (6H, –CH₂CH₂– и –OCH₂P–). ³¹P-ЯМР (δ , м. д., D₂O): 9.9 м (1P, P^α), –9.8 д (1P, J 8.5 Гц, P^γ), –22 м (1P, P^β).

6-Амино-5-нитро-4-[(3',5'-ди-*O*-толуоил-β-*D*-2'-дезоксирибофуранозил)амино]пиримидин (XIV). Суспензию 160 мг (1 ммоль) 4,6-диамино-5-нитропиримидина (XII) в 5 мл *N,O*-бис(триметилсиллил)ацетамида кипятили 6 ч в атмосфере сухого аргона, затем упарили досуха и остаток растворили в 10 мл дихлорэтана. К этому раствору добавили 390 мг (1 ммоль) 1-хлор-3,5-ди-*O*-толуоил-2-дезоксид-α-*D*-рибофуранозы (XIII) и 0.117 мл (1 ммоль) SnCl₄. Реакционную смесь перемешивали 18 ч при 20°C. Затем добавили 5 мл 10% раствора NaHCO₃ и перемешивали 20 мин при 0°C. К полученной суспензии прибавили хлороформ (20 мл), отфильтровали через Hyflo Super Cel, органический слой отделили, промыли водой (10 мл), сушили Na₂SO₄ и выделяли нуклеозид (XIV) хроматографией на силикагеле, элюируя CHCl₃. Выход 250 мг (49%). УФ (MeOH): λ_{\max} 213, 335 нм, λ_{\min} 261 нм. Масс-спектр, *m/z*: (*M* + 1)⁺ 508.5. ¹H-ЯМР (δ , м. д., DMSO-*d*₆): 9.77 д (1H, J_{NH-NH'} 8.2 Гц, NH), 8.47 шс (1H, NH₂), 8.12 с (1H, C2'-H), 8.02 м (2H, ArH), 7.90 м (2H, ArH), 7.30 м (4H, ArH), 6.58 псевдо-д-т (1H, J 7.2 Гц, C1'-H), 6.43 шс (1H, NH₂), 5.67 м (1H, C3'-H), 4.64 м (1H, C4'-H), 4.53 м (2H, C5'-H), 2.75 м (2H, C2'-H), 2.40 с (3H, PhCH₃), 2.39 с (3H, PhCH₃).

6-Амино-5-нитро-4-(2'-дезоксид-β-*D*-рибофуранозиламино)пиримидин (XV). Раствор 160 мг (0.32 ммоль) нуклеозида (XIV) в смеси метанола (5 мл) и диоксана (1 мл) охладили до 0°C, добавили к нему 0.64 мл 0.1 М раствора NaOMe в метаноле и оставили в атмосфере аргона на 18 ч при 8°C. Реакционную смесь нейтрализовали добавлением Dowex 50 (H⁺) до pH 7, смолу быстро отфильтровали. Продукт (XV) выделили из фильтрата хроматографией на силикагеле, элюируя смесью CHCl₃–MeOH, 20 : 1. Выход 59 мг (68%). УФ (H₂O): λ_{\max} 213, 334 нм (ϵ 13000), λ_{\min} 260 нм. Масс-спектр, *m/z*: (*M* + 1)⁺ 272.2. ¹H-ЯМР (δ , м. д., DMSO-*d*₆): 9.95 д (1H, J_{NH-NH'} 8.5 Гц, NH), 8.35 шс (2H, NH₂), 7.99 с (1H, C2'-H), 6.30 дд (1H, J_{NH-NH'} 8.5 Гц, J 4 Гц, C1'-H), 5.40 м (1H, C3'-H), 3.95 м (1H, C4'-H), 3.45 м (2H, C5'-H), 2.24 м (1H, C2'-H_a), 1.86 м (1H, C2'-H_b).

5'-Трифосфат 6-амино-5-нитро-4-(2'-дезоксид-β-*D*-рибофуранозиламино)пиримидина (III). Раствор 45 мг (0.17 ммоль) нуклеозида (XV) в 2 мл триэтилфосфата охладили до 0°C, добавили 0.023 мл (0.25 ммоль) POCl₃, выдерживали 2 ч при 0°C. К полученному раствору добавили охлажденную до 0°C смесь 0.2 мл трибутиламина и 2 мл 0.5 М раствора бис(три-*n*-бутиламмониевой) соли пиро-

фосфорной кислоты в абс. DMF. Температуру реакционной смеси довели до 20°C и добавили 2 мл 1 М раствора HNEt₃HCO₃ в воде. Продукт выделяли хроматографией на DEAE-Toyopearl в градиенте концентрации NH₄HCO₃ (0 → 0.35 М), а затем дополнительно очищали обращенно-фазовой хроматографией на сорбенте LiChroprep RP-18, элюировали водой. Выход 15 мг (15%). УФ (H₂O): λ_{\max} 212, 334 нм (ϵ 13000), λ_{\min} 260 нм. ¹H-ЯМР (δ , м. д., D₂O): 7.84 с (1H, C2'-H), 6.12 д (1H, J 5.9 Гц, C1'-H), 4.45 д (1H, J_{H3'-H2'a} 5.2 Гц, C3'-H), 4.15 м (1H, C4'-H), 3.82 м (2H, C5'-H), 2.39 м (1H, C2'-H_a), 2.02 м (1H, C2'-H_b). ³¹P-ЯМР (δ , м. д., D₂O): –8.3 д (1P, J 21 Гц, P^γ), –10.9 д (1P, J 20 Гц, P^α), –23 м (1P, P^β).

(-)-(1S, 4R)-1-Гидроксиметил-4-[(6'-амино-5'-нитропиримидин-4'-ил)амино]циклопент-2-ен (XIX). Раствор 284 мг (1.25 ммоль) амина (XVII) и 0.247 мл (2.7 ммоль) диизопропилэтиламина в 2 мл метанола охладили до 0°C и добавили порциями по 0.5 мл к суспензии 484 мг (2.5 ммоль) 4,6-дихлор-5-нитропиримидина в 5 мл метанола, охлажденной до 0°C, и перемешивали 2 ч при 8°C. Реакционную смесь упарили при 20°C и выделили продукт (XVIII) хроматографией на силикагеле, элюировали CHCl₃, затем смесью CHCl₃–MeOH, 25 : 1. Выход 152 мг (45%). УФ (MeOH): λ_{\max} 235, 368 нм, λ_{\min} 315 нм. К раствору полученного нуклеозида (XVIII) в 5 мл метанола добавили 0.5 мл метанола, насыщенного аммиаком, смесь перемешивали 3 ч при 20°C. Целевой нуклеозид (XIX) выделили хроматографией на силикагеле, элюировали CHCl₃, смесью CHCl₃–MeOH, 20 : 1. Выход 109 мг (79%, выход в расчете на соединение (XVII) 36%). УФ (H₂O): λ_{\max} 342 нм (ϵ 10100), λ_{\min} 263 нм. Масс-спектр, *m/z*: (*M* + 1)⁺ 252.2. ¹H-ЯМР (δ , м. д., DMSO-*d*₆): 9.27 д (1H, J 8 Гц, NH), 8.58 д (2H, J 13 Гц, NH₂), 8.01 с (1H, C2'-H), 5.94 м (1H, C2'-H), 5.80 м (1H, C3'-H), 5.31 м (1H, C4'-H), 4.89 м (1H, OH), 3.42 м (2H, CH₂O), 2.72 м (1H, C1'-H), 2.43 м (1H, C5_a-H), 1.49 м (1H, C5_b-H).

(-)-(1S, 4R)-1-Трифосфооксиметил-4-[(6'-амино-5'-нитропиримидин-4'-ил)амино]циклопент-2-ен (IV). К раствору 22 мг (0.3 ммоль) 1,2,4-триазола в 1 мл ацетонитрила добавили 0.042 мл (0.3 ммоль) триэтиламина и 0.009 мл (0.1 ммоль) POCl₃, перемешивали 40 мин при 20°C, выпавший осадок удалили центрифугированием, и супернатант добавили к 17 мг (0.07 ммоль) нуклеозида (XIX) в 2 мл ацетонитрила. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 20°C, затем добавили 1 мл 0.5 М раствора бис(три-*n*-бутиламмониевой) соли пирофосфорной кислоты в абс. DMF и перемешивали еще 1 ч при 20°C. После прибавления 50 мл H₂O целевой трифосфат (IV) выделяли хроматографией на DEAE-Toyopearl в градиенте концентрации NH₄HCO₃ (0 → 0.35 М), а затем дополнительно очищали обращенно-фазовой хроматографией на LiChroprep RP-18, элюируя водой. Выход: 10 мг (22%). УФ (H₂O): λ_{\max} 342 нм (ϵ 10100), λ_{\min} 265 нм.

¹H-ЯМР (δ, м. д., D₂O): 7.98 с (1H, C2'-H), 6.05 м (1H, C2-H), 5.85 м (1H, C3-H), 5.18 м (1H, C4-H), 3.94 м (2H, CH₂O), 3.06 м (1H, C1-H), 2.62 м (1H, C5_a-H), 1.53 м (1H, C5_b-H). ³¹P-ЯМР (δ, м. д., D₂O): -8.1 д (1P, J 20 Гц, P^γ), -10.5 д (1P, J 21 Гц, P^α), -23 м (1P, P^β).

(-)-(1S, 4R)-1-Гидроксиметил-4-[(6'-хлоропиримидин-4'-ил)амино]циклопент-2-ен (XX). Раствор 226 мг (1 ммоль) амина (XVII), 289 мг (2 ммоль) 4,6-дихлорпиримидина и 3 мл диизопропилэтиламина в 10 мл *n*-бутанола кипятили 1 ч в атмосфере аргона, добавили 5 мл воды и экстрагировали хлороформом (3 × 10 мл). Объединенные органические слои сушили Na₂SO₄ и нуклеозид (XX) выделяли хроматографией на силикагеле, элюировали CHCl₃, затем смесью CHCl₃-MeOH, 20 : 1. Выход 168 мг (75%). УФ (MeOH): λ_{max} 203, 250 нм, λ_{min} 221 нм. Масс-спектр, *m/z*: (M + 1)⁺ 227. ¹H-ЯМР (δ, м. д., CDCl₃): 8.28 с (1H, C2'-H), 6.32 с (1H, C5'-H), 6.21 шс (1H, NH), 5.85 м (2H, C2-H и C3-H), 4.82-4.50 м (1H, C4-H), 3.69 дд (1H, J 4 и 10 Гц, CH₂O), 3.68 дд (1H, J 4 и 10 Гц, CH₂O), 2.83 м (1H, C1-H), 2.54 м (1H, C5_a-H), 2.39 шс (1H, OH), 1.57 м (1H, C5_b-H).

(-)-(1S, 4R)-1-Гидроксиметил-4-[(6'-аминопиримидин-4'-ил)амино]циклопент-2-ен (XXI). Раствор 87 мг (0.39 ммоль) нуклеозида (XX) в 5 мл метанола, насыщенного при 0°C аммиаком, выдерживали в автоклаве 18 ч при 180°C. Реакционную смесь упарили, продукт (XXI) выделяли хроматографией на силикагеле, элюируя смесью CHCl₃-MeOH, 20 : 1. Выход 64 мг (80%). УФ (H₂O): λ_{max} 225, 268 нм (ε 6350), λ_{min} 250 нм. Масс-спектр, *m/z*: (M + 1)⁺ 207. ¹H-ЯМР (δ, м. д., D₃CO): 7.81 с (1H, C2'-H), 5.86 м (1H, C2-H), 5.75 м (1H, C3-H), 5.49 с (1H, C5'-H), 4.67 м (1H, C4-H), 3.58 м (2H, CH₂O), 2.77 м (1H, C1-H), 2.45 м (1H, C5_a-H), 1.34 м (1H, C5_b-H).

(-)-(1S, 4R)-1-Трифосфооксиметил-4-[(6'-аминопиримидин-4'-ил)амино]циклопент-2-ен (V). Синтез и очистку проводили аналогично получению трифосфата (IV), исходя из 32 мг (0.15 ммоль) нуклеозида (XXI). Выход 13 мг (20%). УФ (H₂O): λ_{max} 226, 268 нм (ε 6350), λ_{min} 246 нм. ¹H-ЯМР (δ, м. д., D₂O): 7.77 с (1H, C2'-H), 5.68 м (1H, C2-H), 5.52 м (1H, C3-H), 5.43 с (1H, C5'-H), 4.47 м (1H, C4-H), 3.66 м (2H, CH₂O), 2.70 м (1H, C1-H), 2.21 м (1H, C5_a-H), 1.35 м (1H, C5_b-H). ³¹P-ЯМР (δ, м. д., D₂O): -8.5 д (1P, J 22 Гц, P^γ), -10.6 д (1P, J 22 Гц, P^α), -21 т (1P, J 22 Гц, P^β).

(-)-(1S, 4R)-1-Монометокситритилоксиметил-4-[(6'-монометокситритиламино)пиримидин-4'-ил)амино]циклопент-2-ен (XXII). Раствор 100 мг (0.49 ммоль) нуклеозида (XXI), 380 мг (1.23 ммоль) монометокситритилхлорида и 0.2 мл (1.45 ммоль) Et₃N в 5 мл дихлорэтана выдерживали 18 ч при 20°C. Реакционную смесь разбавили водой, экстрагировали хлороформом, сушили Na₂SO₄, упаривали. Нуклеозид (XXII) выделяли хроматографией

на силикагеле, элюировали CHCl₃. Выход 265 мг (72%). УФ (H₂O): λ_{max} 225, 268 нм (ε 6350), λ_{min} 250 нм. Масс-спектр, *m/z*: (M + 1)⁺ 752. ¹H-ЯМР (δ, м. д., CDCl₃): 7.94 с (1H, C2'-H), 7.42-7.16 м (1H, MeOTf), 6.45 с (1H, C5'-H), 5.88 м (1H, C2-H), 5.41 м (1H, C3-H), 4.72 м (1H, C4-H), 3.79 с (3H, OCH₃), 3.74 с (3H, OCH₃), 2.94 м (2H, CH₂O), 2.85 м (1H, C1-H), 1.96 м (1H, C5_a-H), 1.03 м (1H, C5_b-H).

(-)-(1S, 4R)-1-Гидроксиметил-4-[N-(6'-аминопиримидин-4'-ил)-N-этиламино]циклопент-2-ен (XXIII). К раствору 205 мг (0.27 ммоль) нуклеозида (XXII) в 5 мл DMF добавляли при перемешивании 16 мг (0.54 ммоль) 80% суспензии NaN в масле и через 15 мин добавили 0.043 мл (0.54 ммоль) этилийодида. Реакционную смесь перемешивали 12 ч, затем упаривали досуха, остаток растворяли в 80% AcOH и выдерживали при 37°C 12 ч. Целевой нуклеозид (XXIII) выделяли хроматографией на силикагеле (CHCl₃). Выход 20 мг (32%). УФ (H₂O): λ_{max} 225, 268 нм (ε 6350), λ_{min} 250 нм. Масс-спектр, *m/z*: (M + 1)⁺ 235. ¹H-ЯМР (δ, м. д., DMSO-d₆): 8.22 с (1H, C2'-H), 6.16 с (2H, NH₂), 5.91 м (1H, C2-H), 5.72 м (1H, C3-H), 5.50 м (2H, C5'-H, C4-H), 4.65 шс (1H, OH), 3.39 м (2H, CH₂O), 3.21 м (2H, N-CH₂), 2.67 м (1H, C1-H), 2.31 м (1H, C5_a-H), 1.19 м (1H, C5_b-H), 1.06 т (3H, J 6.9 Гц, CH₃).

(-)-(1S, 4R)-1-Трифосфооксиметил-4-[N-(6'-аминопиримидин-4'-ил)-N-этиламино]циклопент-2-ен (VI). Синтез и очистку проводили аналогично получению трифосфата (IV), исходя из 20 мг (0.085 ммоль) нуклеозида (XXIII). Выход 8 мг (20%). УФ (H₂O): λ_{max} 342 нм (ε 10100), λ_{min} 265 нм. ¹H-ЯМР (δ, м. д., D₂O): 7.93 с (1H, C2'-H), 6.08 м (1H, C2-H), 5.87 м (1H, C3-H), 5.83 м (1H, C5'-H), 4.95 м (1H, C4-H), 4.04 м (2H, CH₂O), 3.47 м (2H, N-CH₂), 3.07 м (1H, C1-H), 2.73 м (1H, C5_a-H), 1.51 м (1H, C5_b-H), 1.17 т (3H, J 7 Гц, CH₃).

Авторы выражают благодарность доктору С.М. Робертсу и фирме Chiroscience за любезно предоставленный карбоциклический лактам (XVI). Работа частично финансировалась грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 99-04-48315.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Revich G.G., Beattie K.L. // Carcinogenesis. 1986. V. 7. P. 1569-1576.
2. Prober J.M., Trainor G.L., Dam R.J., Hobbs F.W., Robertson C.W., Zagursky R.J., Cocuzza A.J., Jensen M.A., Baumeister K. // Science. 1987. V. 238. P. 336-341.
3. Trainor G.L., Jensen M.A. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 11846.
4. Livak K.J., Hobbs F.W., Zagursky R.J. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 4831-4837.
5. Berger M., Wu Y., Ogawa A.K., McMinn D.L., Schultz P.G., Romesberg F.E. // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 2911-2914.

6. Wright G.E., Brown N.C. // *Pharmacol. Ther.* 1990. V. 47. P. 447–497.
7. Votruba I., Travnicek M., Rosenberg I., Otmar M., Metra A., Hrebabecky H., Holy A. // *Antiviral Res.* 1990. V. 13. P. 287–294.
8. Franchetti P., Cappellacci L., Abu Sheikha G., Grifantini M., Loi A.G., De Montis A., Spiga M.G., La Colla P. // *Nucleosides Nucleotides.* 1995. V. 14. P. 607–610.
9. Eger K., Klunder E.M., Schmidt M. // *J. Med. Chem.* 1994. V. 37. P. 3057–3061.
10. Moss R.J., Petrie C.R., Meyer R.B., Jr., Nord L.D., Willis R.C., Smith R.A., Larson S.B., Kini G.D., Robins R.K. // *J. Med. Chem.* 1988. V. 31. P. 786–790.
11. Ludwig J. // *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 1981. V. 16. P. 131–133.
12. Parno W.B., White E.L., Shadix S.C., Ross L.J., Buchheit R.W., Germannes J.M.R., Secrist III J.A., Vince R., Shannon W.M. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 226. P. 1754–1762.
13. Katagiri N., Ito Y., Shiraishi T., Maruyama T., Sato Y., Kaneko C. // *Nucleosides Nucleotides.* 1996. V. 15. P. 631–647.
14. Ясько М.В., Новиков Н.А., Тарусова Н.Б. // *Биоорганич. химия.* 1994. Т. 20. С. 50–54.
15. Сергеева Н.Ф., Смирнов В.Д., Шабарова З.А., Прокофьев М.А., Зарытова В.Ф., Лебедев А.В., Кнорре Д.Г. // *Биоорганич. химия.* 1976. Т. 2. С. 1056–1062.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.

Synthesis and Substrate Properties of Modified Nucleoside 5'-Triphosphates Mimicking dATP in the Reactions of DNA Synthesis Catalyzed by DNA Polymerases

Yu. A. Sharkin*[#], D. G. Semizarov*, L. S. Victorova*^{**,*}, and M. N. Kukhanova*

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

**Moscow Center for Medical Studies of University of Oslo, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

Several modified nucleoside 5'-triphosphates were synthesized containing adenine-mimicking pyrimidine derivatives as an aglycone. The study of substrate properties of these compounds towards DNA-synthesizing enzymes showed their ability of being incorporated into the growing DNA chain in place of dATP. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: adenine analogues, carbocycle, DNA polymerases, modified nucleotides, pyrimidine

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 135-6065; e-mail: chernov@imb.ac.ru.