



УДК 577.113.3:547.963.057

ИЗОСТЕРНЫЕ ТРИФОСФОНАТНЫЕ АНАЛОГИ dNTP: СИНТЕЗ И СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА ПО ОТНОШЕНИЮ К РАЗЛИЧНЫМ ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМ

© 2007 г. А. Ю. Скоблов*, А. Н. Семенов**, А. М. Мурабулдаев***, В. В. Сосунов****,
Л. С. Викторова**, Ю. С. Скоблов*#

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;

***ООО “Высокие технологии”, Москва;

****ГУ ЦНИИ туберкулеза, Москва

Поступила в редакцию 19.06.2006 г. Принята к печати 21.06.2006 г.

Синтезированы изостерные трифосфонатные производные 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидроаденозина и 3'-дезокси-2',3'-дидегидротимидина и их β,γ -замещенные аналоги. Изучены их субстратные свойства по отношению к ряду ДНК-полимераз – обратным транскриптазам вирусов иммунодефицита человека и миелобластога птиц, ДНК-полимераза α и β человека, фрагменту Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*.

Ключевые слова: изостерные аналоги dNTP, субстратные свойства; ДНК-полимеразы человека; обратные транскриптазы вируса иммунодефицита человека и вируса миелобластога птиц; фрагмент Кленова.

ВВЕДЕНИЕ

Создание новых эффективных антиретровирусных агентов – важная и актуальная задача, решаемая на протяжении последних 25 лет. Многие группы исследователей пытались получить различные модифицированные нуклеозиды и изучить их антивирусные свойства. В настоящее время известно довольно много соединений нуклеозидной природы, проявляющих анти-ВИЧ-активность [1]. Установлено, что модифицированному нуклеозиду для включения в растущую цепь ДНК необходимо пройти внутри клетки через три стадии фосфорилирования с образованием соответствующего нуклеозид-5'-трифосфата [2]. Поэтому при создании новых антивирусных агентов большое внимание уделяется как исследованию путей метаболизма модифицированных нуклеозидов, так и изучению субстратной специфичности соответствующих нуклеозид-5'-трифосфатов по отношению к различным ДНК-полимераза [3].

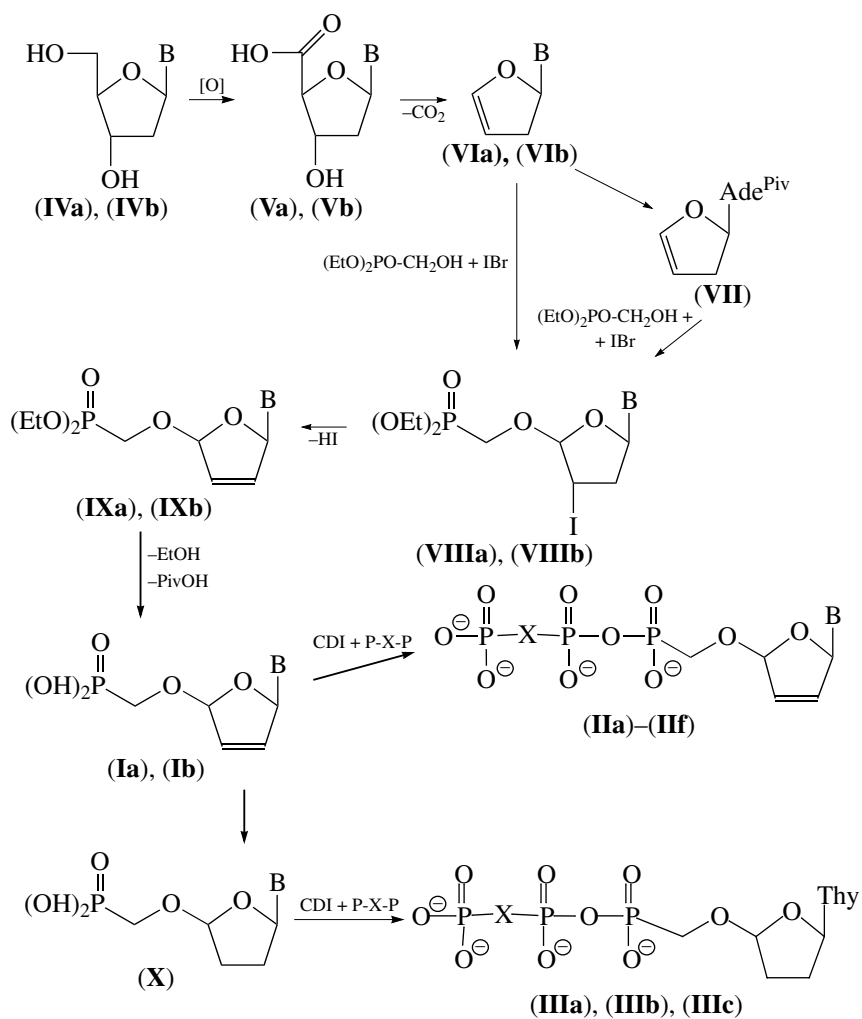
Известно, что dNTP плохо проникают через клеточные мембраны и быстро дефосфорилируются в межклеточных и клеточных средах. Поэтому один из возможных путей создания новых антивирусных препаратов – синтез соединений, модифицированных по трифосфатному остатку, устойчивых к ферментативному дефосфорилированию и при этом селективными субстратами ретровирусных обратных транскриптаз [4].

Ранее было показано, что изостерные фосфонатные аналоги нуклеотидов (**Ia**) и (**Ib**) обладают антивирусной активностью [5]. Описаны синтез и некоторые свойства изостерных аналогов нуклеозидтрифосфатов, содержащих циклопентенильный остаток вместо гликона и трифосфонатный остаток вместо трифосфата [6]. Установлено, что такие соединения обладают высокой стабильностью в сыворотке крови человека и некоторые из них являются селективными терминаторными ингибиторами синтеза ДНК, катализируемого обратной транскриптазой ВИЧ.

В этой работе мы представляем синтез изостерных аналогов нуклеозид-5'-трифосфатов (**IIa**)–(**IIf**) и данные по изучению их субстратных свойств в реакциях элонгации ДНК, катализируемых обратными транскриптазами вируса иммунодефицита человека (ОТ ВИЧ) и вируса миелобластога птиц (ОТ ВМП), ДНК-полимеразами α и β человека и фрагментом Кленова (ФК) ДНК-полимеразы I *E. coli*.

Сокращения: CDI – 1,1'-карбонилдиимидазол; ДТТ – дитиотреит; ddNTP – 2',3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфат; d₄NTP – 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидронуклеозид-5'-трифосфат; Piv – пивалоил; ТСА – трихлоруксусная кислота; ОТ ВИЧ и ОТ ВМП – обратные транскриптазы вирусов иммунодефицита человека и миелобластога птиц; ФК – фрагмент Кленова.

Автор для связи (тел.: (495) 330-69-47; эл. почта: sur@ibch.ru).



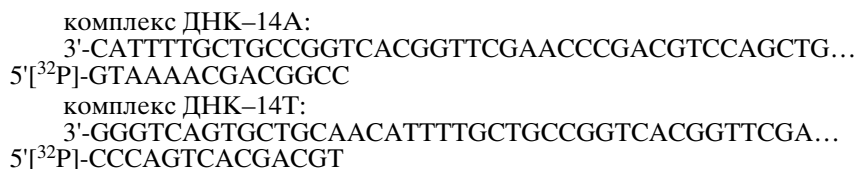
Соединение	B	X	Соединение	B
(Ia)	Ade	–	(IVa)	Ade
(Ib)	Thy	–	(IVb)	Thy
(IIa)	Ade	O	(Va)	Ade
(IIb)	Ade	CF ₂	(Vb)	Thy
(IIc)	Ade	CBr ₂	(VIa)	Ade
(IId)	Thy	O	(VIb)	Thy
(IIe)	Thy	CCl ₂	(VII)	PivAde
(IIf)	Thy	NH	(VIIIa)	Ade
(IIIa)	Thy	O	(VIIIb)	Thy
(IIIb)	Thy	CCl ₂	(IXa)	PivAde
(IIIc)	Thy	NH	(IXb)	Thy
			(X)	Thy

Схема синтеза соединений (I)–(X).

му ранее методу [15]. Выход конечных продуктов (IIa)–(IIf) колебался от 35 до 65%. Дидезокситимидиновые производные (IIIa)–(IIIc) получали по

методу, предложенному в работе [16].

Субстратные свойства



В первой серии экспериментов с использованием праймер-матричного комплекса ДНК–14А мы изучали способность изостерных аналогов ddATP (IIa)–(IIc) удлинять праймер на один нуклеотидный остаток и, тем самым, проявлять свойства терминаторных субстратов как для ОТ ВИЧ и ОТ ВМП, так и для ДНК-полимераз α и β человека. Результаты тестирования субстратных свойств этих соединений по отношению к ОТ ВИЧ и ОТ ВМП представлены на рис. 1а и 1б соответственно. В качестве контрольных субстратов использовали dATP (рис. 1а, дорожки 5–7 и рис. 1б, дорожки 2–4), а также ddATP (рис. 1а, дорожки 2–4). Видно, что ОТ ВИЧ и ОТ ВМП катализируют включение в ДНК соединения (IIa) (рис. 1а, дорожки 8–11 и рис. 1б, дорожки 5–7) с той же эффективностью, как и включение dATP и ddATP. В то же время соединения (IIb) и (IIc) (рис. 1а, дорожки 12–15 и 16–19; рис. 1б, дорожки 8–10 и 11–13 соответственно) включались в ДНК

значительно слабее. Удлинение праймера 14А на один нуклеотидный остаток при катализе ОТ ВИЧ происходит с одинаковой эффективностью в присутствии как 0.1 мкМ dATP, ddATP и (IIa), так и 20 мкМ (IIb) и (IIc), а при катализе ОТ ВМП – 0.2 мкМ dATP и (IIa), 40 мкМ (IIb) и (IIc) соответственно.

Сравнение приведенных в табл. 1 кинетических параметров односубстратной реакции элонгации праймера для соединений (IIa)–(IIc) показывает, что модификации в β,γ -пирофосфатной части молекулы снижают сродство субстрата к ОТ ВИЧ в 30–50 раз. Вместе с тем скорость включения модифицированных соединений (IIa)–(IIc) в ДНК этим ферментом достаточно высока и близка к скорости включения ddATP.

Репаративная ДНК-полимераза β человека также оказалась способной использовать исследуемые аналоги нуклеозидтрифосфатов (IIa)–(IIc) в

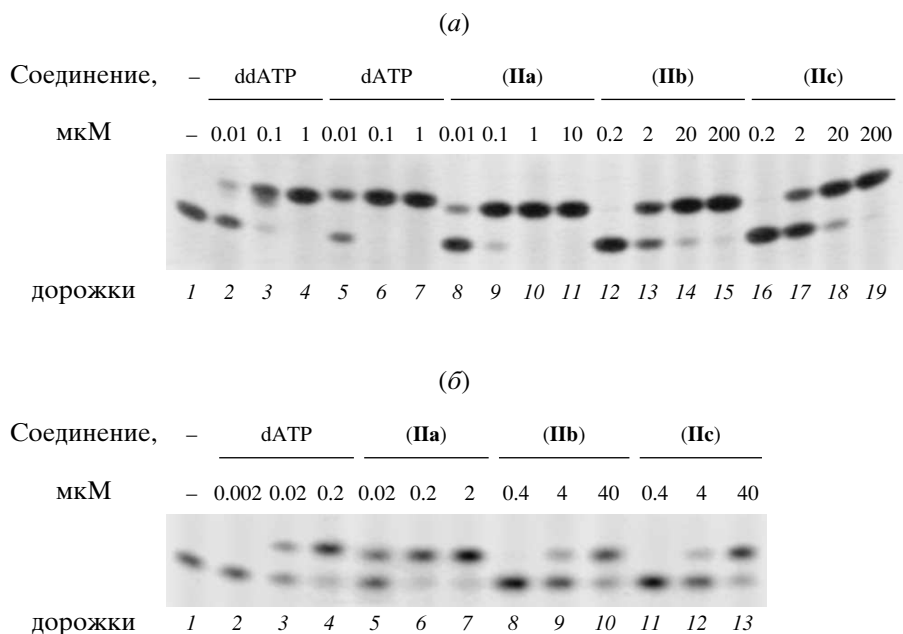


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов реакции удлинения праймера в комплексе ДНК–14А соединениями (IIa), (IIb) и (IIc) при катализе ОТ ВИЧ (а) и ОТ ВМП (б). Контроли (дорожки 1) – праймер-матричный комплекс + фермент. Для сравнения в качестве субстратов использованы dATP и ddATP.

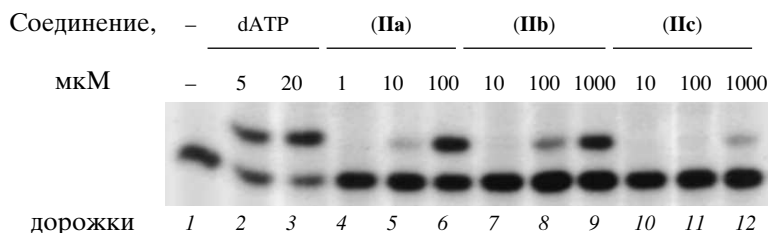


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов катализируемой ДНК-полимеразой β реакции удлинения праймера в комплексе ДНК-14A соединениями (IIa), (IIb) и (IIc). Контроль (дорожка 1) – праймер-матричный комплекс + фермент.

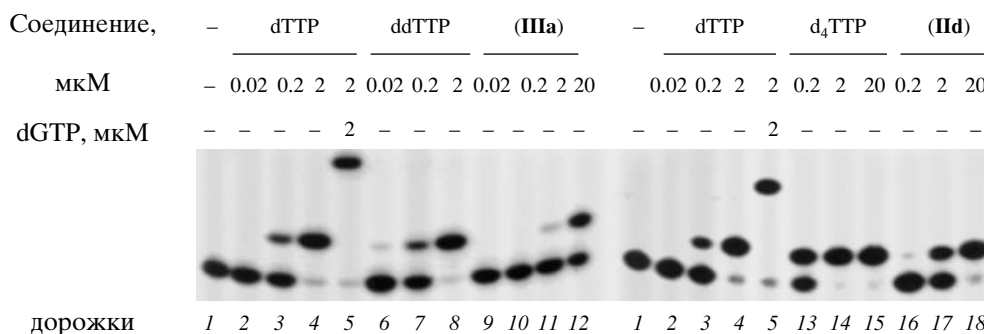


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов реакции удлинения праймера в комплексе ДНК-14T соединениями (IIIa) и (IIIд) при катализе ОТ ВИЧ. Контроль (дорожка 1) – праймер-матричный комплекс + фермент. Для сравнения в качестве субстратов использованы dTTP, ddTTP и d₄TTP.

качестве терминаторных субстратов синтеза ДНК, хотя и с весьма низкой эффективностью (рис. 2). Соединение (IIa) включалось в праймер примерно в 20 раз меньше, чем dATP (дорожки 6 и 2 соответственно). Соединения (IIb) и (IIc) – еще менее эффективные субстраты. Тестированные в этой серии соединения можно расположить в порядке убывания их субстратных свойств по отношению к ДНК-полимеразе β следующим образом: dATP (5 мкМ) > (IIa) (100 мкМ) > (IIb) (1 мМ) \gg (IIc) (1 мМ) (в скобках даны концентрации соединений, при которых реакция элонгации в данных условиях проходит на 50%). Следует заметить, что карбоциклические изостерные аналоги d₄ATP (как без дополнительных модификаций фосфонатного остатка, так и с β, γ -CF₂- и β, γ -CBr₂-заместителями) вообще не проявляли субстратных свойств по отношению к ДНК-полимеразе β человека [17].

Мы нашли, что синтезированные нами соединения (IIa)–(IIe) не проявляют субстратных свойств в реакциях, катализируемых ДНК-полимеразой α человека, они не включаются в ДНК (данные не приведены). Ранее было показано, что d₄NTP не являются субстратами ДНК-полимеразы α тимуса теленка [18]. Таким образом, введение изостерной модификации (–С-5'–О–) и дополнительных модификаций β, γ -фосфатной части молекулы не привело к появлению у соединений субстратных свойств по отношению к этому ферменту.

Во второй серии экспериментов были изучены субстратные свойства производных тимидина (IIIд)–(IIIf) и (IIIa)–(IIIc) по отношению к ОТ ВИЧ и ФК ДНК-полимеразы I с использованием праймер-матричного комплекса ДНК-14Т. Изостерный аналог ddTTP (IIIa) оказался примерно в 20 раз менее эффективным терминаторным субстратом ОТ ВИЧ, чем ddTTP (рис. 3, дорожки 9–12 и 6–8 соответственно), а изостерный аналог d₄TTP (IIIд) был почти на порядок менее эффективен, чем d₄TTP (рис. 3, дорожки 16–18 и 13–15 соответственно).

Модификация β, γ -фосфатной части изостерных аналогов d₄TTP привела к заметному уменьшению способности соединений (IIIe) и (IIIf) включаться в цепь ДНК ОТ ВИЧ (рис. 4a). Так, соеди-

Таблица 1. Константы Михаэлиса (K_m) и скорости реакций (V_{max}/V_{max}^{ddATP}) в катализируемых ОТ ВИЧ реакциях удлинения праймера 14A на один нуклеотидный остаток для ddATP и изостерных аналогов (IIa), (IIb), (IIc)

Соединение	K_m , мкМ	V_{max}/V_{max}^{ddATP}
ddATP (контроль)	0.095 ± 0.025	1
(IIa)	0.185 ± 0.045	6.2
(IIb)	6.37 ± 0.89	1.32
(IIc)	6.44 ± 1.45	1.41

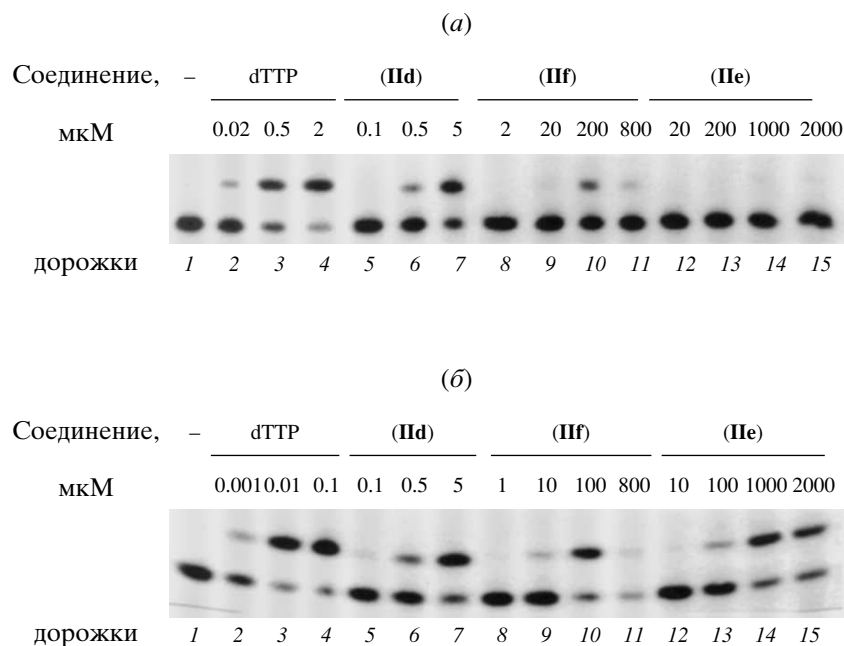


Рис. 4. Электрофореграммы продуктов реакции удлинения праймера в комплексе ДНК–14Т соединениями (II_d), (II_f) и (II_e) при катализе ОТ ВИЧ (а) и ФК ДНК-полимеразы I *E. coli* (б). Контроль (дорожки 1) – праймер-матричный комплекс + фермент. Для сравнения в качестве субстрата использован dТТР.

нение (II_d) (дорожки 5–7) включалось в праймер на порядок хуже, чем dТТР (дорожки 2–4), но было почти в 400 раз более эффективным терминаторным субстратом, чем (II_f) (дорожки 8–11). Соединение (II_e) (дорожки 12–15) практически не проявляло субстратных свойств в исследованном диапазоне концентраций.

Несколько иные результаты были получены для этих соединений в односубстратных реакциях, катализируемых ФК ДНК-полимеразы I (рис. 4б). Соединение (II_d) (дорожки 5–7) в 500 раз хуже узнавалось ферментом, чем dТТР (дорожки 2–4), но соответственно в 20 и в 200 раз лучше, чем соединения (II_f) (дорожки 8–11) и (II_e) (дорожки 12–15).

Определить значения K_m для соединений (II_e) и (II_f) оказалось затруднительным вследствие их очень низкой субстратной активности. Поэтому

Таблица 2. Ингибирование катализируемого ОТ ВИЧ синтеза poly(dT) модифицированными аналогами тимидинтрифосфатов (II_d), (II_e), (II_f)

Соединение	A*
d ₄ ТТР (контроль)	0.15
(II _d)	1.5
(II _e)	>1000
(II _f)	100

* A – отношение молярных концентраций [модифицированный нуклеотид]/[dТТР], при котором синтез ДНК ингибируется на 50%.

для количественной оценки свойств соединений (II_d)–(II_f) в качестве терминаторных субстратов ОТ ВИЧ мы сравнили их способность ингибировать катализируемую этим ферментом реакцию включения [³H]dТТР в poly(rA)-oligo(dT). Приведенные в табл. 2 результаты позволяют сравнить молярные концентрации соединений (II_d)–(II_f), при которых на 50% ингибируется включение в oligo(dT) меченого субстрата. Видно, что дополнительные модификации в пирофосфатной части соединения (II_d) привели к практически полной потере субстратных свойств соединениями (II_e) и (II_f).

Обычно обратные транскриптазы ретровирусов наименее чувствительны к модификациям сахарных и фосфатных остатков dНТР. В нашем случае для аналога ddТТР соединения (II_a) замена фосфатного остатка на изостерный фосфонатдифосфатный остаток привела к уменьшению его субстратной активности по сравнению с dТТР и ddТТР более чем в 10 раз (см. рис. 3). Ранее было показано, что изостерные карбоциклические аналоги d₄АТР и d₄ГТР – эффективные терминаторные субстраты ОТ ВИЧ, а их β,γ-CF₂-замещенные производные в тех же условиях примерно в 100 раз хуже узнаются ферментом [19]. В то же время β,γ-CBr₂-замещенные аналоги практически полностью теряли субстратные свойства в реакциях, катализируемых этим ферментом [17, 19]. В нашем случае β,γ-замещенные аналоги d₄АТР оказались субстратами как ОТ ВИЧ, так и ОТ ВМП. При этом соединения (II_b) (β,γ-CF₂) и (II_c) (β,γ-CBr₂) демонстрировали практически

одинаковые субстратные свойства по отношению к ОТ ВИЧ, но более чем на два порядка величины уступали в активности незамещенному соединению (**IIa**) (см. рис. 1 и табл. 1).

Таким образом, можно сделать вывод, что обнаруженная ранее анти-ВИЧ-активность соединений (**Ia**) и (**Ib**) обусловлена способностью ОТ ВИЧ селективно узнавать их дифосфатные производные в качестве субстратов. После стадии узнавания эти производные терминируют синтез вирусной ДНК, ОТ ВИЧ, оказывая весьма незначительное воздействие на другие клеточные ДНК-полимеразы. Вместе с тем дополнительные модификации соединений (**II**) по β, γ -фосфатным остаткам молекул резко снижают их субстратные свойства по отношению ко всем протестированным ДНК-полимеразам.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках Kieselgel-60 (Merck, Германия) с использованием системы: хлороформ–этанол, 9 : 1 (А), а также на пластинках Silufol (Kavalier, Чехия) в системе диоксан–аммиак–вода, 6 : 3 : 4 (В).

Для колоночной хроматографии использовали: Kieselgel 60 (60–100 мкм) (Merck, Германия), Dowex 50-8 (Sigma, США), Toyopearl 650M DEAE (Toyo Soda, Япония), DEAE-целлюлозу (Reanal, Венгрия). ВЭЖХ проводили на хроматографе Gilson (Франция) на колонке Silasorb-Sph C-18, 5 мкм, 4 × 150 мм (Елсико, Россия). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss Jena, Германия): для нуклеозидов – в метаноле, для нуклеотидов – в воде, кроме специально оговоренных случаев.

Спектры ^1H - и ^{31}P -ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker 250 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 101.3 МГц (δ , м.д., КССВ, Гц) (стандарт – 85% H_3PO_4).

В работе использовали Bu_3N , CDI, трихлорид фосфора, 4-(*N,N*-диметиламино)пиридин (Fluka, Германия); 2'-дезоксаденозин и динеопентилацеталь *N,N*-диметилформамида (Aldrich, США); акриламида и *N,N'*-метиленбисакриламид (Promega Corp., США); Трис- HCl (Sigma, США). dNTP, ddATP и ddTTP (Boehringer Mannheim, Германия) перед применением в биохимических экспериментах дополнительно очищали с помощью ВЭЖХ. d_4TTP синтезировали по методу, описанному в работе [20]; радиоактивно меченные соединения [^3H]dTTP с уд. акт. 46.6 Ки/ммоль и [γ - ^{32}P]ATP с уд. акт. 3000 Ки/ммоль производства Центра коллективного пользования “Фосфор” РАН (Россия).

1- β -(Аденин-9-ил)-D-рибуроновая кислота (Va). К раствору 1.005 г (4 ммоль) 2'-дезоксаденозина в 500 мл воды добавляли при комнатной температуре и перемешивании раствор 2.52 г (16 ммоль) перманганата калия в 400 мл воды и раствор 0.79 г (12 ммоль) КОН в 50 мл воды. После перемешива-

ния в течение 2 сут избыток перманганата разлагали 30%-ным раствором H_2O_2 . Выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали до 30 мл, pH раствора доводили до 4.5 концентрированным раствором HCl . Продукт выпадал в виде белых кристаллов, их отделяли и высушивали. Анализировали ТСХ в системе В. Получили 0.3 г (28%) соединения (**Va**). λ_{max} 260 нм (H_2O). ^1H -ЯМР ($\text{DMSO-}d_6$): 8.44 (1 H, с, H8), 8.17 (1 H, с, H2), 7.26 (2 H, с, NH_2), 6.53 (1 H, м, H1'), 4.65 (1 H, м, H3'), 4.35 (1 H, д, J 7, H4'), 2.18 (2 H, м, H2').

(2'R)-9-(2,3-Дигидрофуран-2-ил)аденин (VIa). 1- β -(Аденин-9-ил)-D-рибуроновую кислоту (**Va**) (0.26 г, 1 ммоль) нагревали с 0.69 г (3 ммоль) динеопентилацетата DMF в 2 мл DMF при 80–85°C в течение 5 ч, после чего смесь упаривали досуха. Продукт кристаллизовался при упаривании, его очистку проводили перекристаллизацией из этанола с каплей триэтиламина. Анализировали ТСХ в системе А. Получили 0.13 г (65%) соединения (**VIa**). λ_{max} 260 нм (95%-ный этанол). ^1H -ЯМР ($\text{DMSO-}d_6$): 8.22 (2 H, с, H8), 6.78 (1 H, м, H5'), 6.35 (1 H, м, H2'), 6.27 (2 H, с, NH_2), 5.01 (1 H, м, H4'), 3.19 (2 H, м, H3').

(2'R)-9-(2,3-Дигидрофуран-2-ил)-N⁶-пивалоиладенин (VII). К раствору 2.0 г (10 ммоль) соединения (**VIa**) в 10 мл 1,2-дихлорэтана и 1.7 мл (12 ммоль) триэтиламина добавляли 1.5 г (12 ммоль) пивалоилхлорида и 170 мг 4-(*N,N*-диметиламино)пиридина. После нагревания при 55–60°C в течение 6 ч смесь упаривали в вакууме. Оставшееся масло растворяли в 30 мл дихлорметана, промывали последовательно водой, 20%-ным раствором H_3PO_4 и насыщенным раствором NaCl , сушили над MgSO_4 и упаривали досуха. Полученный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле, используя в качестве элюента смесь дихлорметан – 3% метанол. Анализировали ТСХ в системе А. Получили 2.5 г (85%) соединения (**VII**). λ_{max} 285 нм (95%-ный этанол). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 8.73 (1 H, с, H8), 8.51 (1 H, с, NH), 8.18 (1 H, с, H2), 6.48 (1 H, м, H5'), 6.41 (1 H, дд, J 3.5, 9.4, H2'), 5.24 (1 H, м, H4'), 2.29 (2 H, м, H3'), 1.24 (9 H, с, CH_3).

(2'R,3'S,5'R)-9-(2-Диэтоксифосфиноилметокси-3-йодтетрагидрофуран-5-ил)-N⁶-пивалоиладенин (VIIIa). К раствору 861 мг (3.0 ммоль) соединения (**VII**) и 1.6 г (11 ммоль) диэтил(гидроксиэтил)фосфоната в 7 мл дихлорметана при –25°C добавляли раствор 1.2 г (6.0 ммоль) I^1Br в 10 мл дихлорметана в течение 5 мин. После перемешивания при –25°C в течение 45 мин смесь экстрагировали дихлорметаном с водным раствором NaHCO_3 . Органическую фазу промывали водным раствором бисульфита натрия, сушили над MgSO_4 и упаривали досуха. Вещество очищали на хроматографической колонке, заполненной силикагелем, элюируя смесью дихлорметан – 3%-ный метанол. Анализировали ТСХ в системе А. Получили 1 г (65%) соеди-

нения (**VIIIa**) в виде бесцветного масла. λ_{\max} : 285 нм (95%-ный этанол). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 8.69 (1 Н, с, Н8), 8.51 (1 Н, с, NH), 8.27 (1 Н, с, Н2), 6.83 (1 Н, т, J 6.5, Н5'), 5.46 (1 Н, с, Н2'), 4.45 (1 Н, д, J 5.9, Н3'), 3.7–4.0 (2 Н, м, PCH_2), 3.76 (4 Н, м, CH_2 (Et)), 3.16 (1 Н, дд, J 5.9, 6.5, 14.9, Н2_a'), 2.84 (2 Н, дд, J 6.5, 14.9, Н2_b'), 1.41 (6 Н, м, CH_3 (Et)), 1.32 (9 Н, с, CH_3 (Piv)). ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): 20.34 (с).

(2'R,5'R)-9-(2-Диэтоксифосфиноилметокси-2,5-дигидрофуран-5-ил)-N⁶-пивалоиладенин (IXa). К раствору 1.2 г (2.1 ммоль) соединения (**VIIIa**) в 20 мл THF добавляли 610 мг (4 ммоль) 1,8-дизабцикло[5.4.0]ундец-7-ена и нагревали при 65°C в течение 50 мин. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в дихлорметане, промывали 20%-ным раствором H_3PO_4 и насыщенным раствором NaCl, после чего упаривали досуха. Продукт очищали на хроматографической колонке, заполненной силикагелем, используя в качестве элюента смесь дихлорметан – 5%-ный метанол. Анализировали ТСХ в системе А. Получили 848 мг (90%) соединения (**IXa**). λ_{\max} 285 нм (95%-ный этанол). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 8.66 (1 Н, с, Н8), 5.51 (1 Н, с, NH), 8.04 (1 Н, с, Н2), 7.0 (1 Н, д, J 1.5, Н5'), 6.34 (1 Н, дд, J 1.5, 6.0, Н4'), 6.27 (1 Н, д, J 6.0, Н3'), 5.87 (1 Н, с, Н2'), 3.90 (2 Н, м, PCH_2), 3.64 (4 Н, м, CH_2 (Et)), 1.40 (6 Н, м, CH_3 (Et)), 1.31 (9 Н, с, CH_3 (Piv)). ^{31}P -ЯМР (CDCl_3): 19.98 (с).

9-[(2R,5R)-2,5-Дигидро-5-фосфонометокси-фуран-2-ил]аденина аммониевая соль (Ia). К раствору 326 мг (0.76 ммоль) соединения (**IXa**) в 1 мл метанола добавляли 1 мл насыщенного раствора NH_3 в метаноле. После перемешивания при 25°C в течение 12 ч реакционную смесь упаривали досуха, полученный белый осадок высушивали под вакуумом над P_2O_5 . Без очистки вещество растворяли в 1 мл DMF и при 0°C к раствору добавляли 2 мл свежеперегнанного триметилсиллбромид. Раствор перемешивали 1 ч при 0°C и 2 ч при 25°C. Смесь упаривали и добавляли 3 мл концентрированного раствора NH_4OH . Затем упаривали досуха. Полученный продукт очищали хроматографией на обращенной фазе (силикагель С18), используя воду в качестве элюента. Анализировали ТСХ в системе В. Получили 114 мг (45%) белого аморфного порошка соединения (**Ia**). λ_{\max} 260 нм (H_2O). ^1H -ЯМР (D_2O): 8.13 (1 Н, с, Н8), 7.87 (1 Н, с, Н2), 6.82 (1 Н, с, Н5'), 6.50 (1 Н, д, J 6.0, Н4'), 6.46 (1 Н, д, J 6.0, Н3'), 5.99 (1 Н, с, Н2'), 3.69 (1 Н, дд, J 9.3, 13.2, PCH_a), 3.59 (1 Н, дд, J 9.3, 13.2, PCH_b). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 15.9 (с).

Дифосфорил-(2'R,5'R)-9-(5-фосфонометокси-2,5-дигидрофуран-2-ил)аденин (IIa). К раствору 20 мг (64 мкмоль) аммонийной соли соединения (**Ia**) в 1 мл DMF прибавляли 100 мг (0.64 ммоль) CDI. Через 2 ч в реакционную смесь добавляли 1.3 мл (1.3 ммоль) 1 М раствор бис(триэтилаmmo-

ний)пирофосфата в DMF. Спустя 4 ч смесь упаривали, полученный продукт наносили на колонку с DEAE-Toyorearl и элюировали в градиенте концентрации (от 0 до 0.5 М) раствора $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$. Очистку продукта проводили методом ВЭЖХ на колонке с силикагелем С18 в ион-парном режиме (50 мМ триэтиламмоний бикарбонат). Элюировали вещество градиентом этанола 0–15%. Время удерживания продукта на колонке составляло 12.8 мин. Анализировали ТСХ в системе В. Получили 12 мг (40%) соединения (**IIa**). λ_{\max} 260 нм (H_2O). ^1H -ЯМР (D_2O): 8.13 (1 Н, с, Н8), 7.87 (1 Н, с, Н2), 6.82 (1 Н, с, Н5'), 6.50 (1 Н, д, J 6.0, Н4'), 6.46 (1 Н, д, J 6.0, Н3'), 5.99 (1 Н, с, Н2'), 3.69 (1 Н, дд, J 9.3, 13.2, PCH_a), 3.59 (1 Н, дд, J 9.3, 13.2, PCH_b). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 8.9 (1 Р, д, J 26, P^α), –10.0 (1 Р, д, J 19, P^β), –22.5 (1 Р, дд, P^β).

(β , γ -Дифторметилен)дифосфорил-(2'R,5'R)-9-(5-фосфонилметокси-2,5-дигидрофуран-2-ил)аденин (IIb). Синтез, выделение и очистку соединения (**IIb**) проводили аналогично соединению (**IIa**). Использовали 20 мг (64 мкмоль) триэтиламмониевой соли (**Ia**), 100 мг (0.64 ммоль) CDI и 1.3 мл (1.3 ммоль) 1 М раствора дифторметилендифосфоновой кислоты в триэтиламмониевой форме. Время удерживания продукта на колонке с силикагелем с обращенной С18-фазой составляло 13.3 мин. Анализировали ТСХ в системе В. Получили 23 мг (73%) соединения (**IIb**). λ_{\max} 260 нм (H_2O). ^1H -ЯМР (D_2O): 8.13 (1 Н, с, Н8), 7.87 (1 Н, с, Н2), 6.82 (1 Н, с, Н5'), 6.50 (1 Н, д, J 6.0, Н4'), 6.46 (1 Н, д, J 6.0, Н3'), 5.99 (1 Н, с, Н2'), 3.69 (1 Н, дд, J 9.3, 13.2, PCH_a), 3.59 (1 Н, дд, J 9.3, 13.2, PCH_b). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 9.9 (1 Р, м, P^α), 4.0 (1 Р, м, P^β), –4.2 (1 Р, м, P^β).

(β , γ -Дибромметилен)дифосфорил-(2'R,5'R)-9-(5-фосфонилметокси-2,5-дигидрофуран-2-ил)аденин (IIc) получали, выделяли и очищали как описано для соединения (**IIa**). Использовали 20 мг (64 мкмоль) триэтиламмониевой соли (**Ia**), 100 мг (0.64 ммоль) CDI, 1.3 мл (1.3 ммоль) 1 М дибромметилендифосфоновой кислоты в триэтиламмониевой форме. Время удерживания на колонке составляло 14 мин. Анализировали ТСХ в системе В. Получили 27 мг (69%) соединения (**IIc**). λ_{\max} 260 нм (H_2O). ^1H -ЯМР (D_2O): 8.13 (1 Н, с, Н8), 7.87 (1 Н, с, Н2), 6.82 (1 Н, с, Н5'), 6.50 (1 Н, д, J 6.0, Н4'), 6.46 (1 Н, д, J 6.0, Н3'), 5.99 (1 Н, с, Н2'), 3.69 (1 Н, дд, J 9.3, 13.2, PCH_a), 3.59 (1 Н, дд, J 9.3, 13.2, PCH_b). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 9.9 (1 Р, м, P^α), 4.0 (1 Р, м, P^β), –4.2 (1 Р, м, P^β).

1- β -(Тимин-1-ил)-D-рибуоновая кислота (Vb). При охлаждении (–20°C) и перемешивании готовили раствор 12 г (120 ммоль) CrO_3 в 120 мл пиридина, после чего, не прекращая перемешивания, довели температуру раствора до комнатной. Пиридин упаривали досуха при пониженном давлении, добавляли 100 мл DMF, и после полного растворения комплекса, упаривали на 1/3 объема. К полученному реагенту Джонса в DMF добавляли

при перемешивании растворенный в 10 мл DMF тимидин (3 г, 12.4 ммоль) и оставляли на 5 ч при комнатной температуре. Ход реакции контролировали при помощи ТСХ на пластинках Silufol в системе (В). Затем в реакционную смесь добавляли 500 мл воды и 24 г (180 ммоль) насыщенного раствора двузамещенного фосфата аммония в 1%-ном водном аммиаке. Через сутки выпавший осадок отфильтровывали, неорганические соли из маточного раствора удаляли обращенно-фазовой хроматографией. Продукт выделяли при помощи ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации (0–0.3 М) раствора бикарбоната аммония. Аммониевую соль замещенной рибуриновой кислоты переводили в кислую форму при помощи ионообменной хроматографии (DOWEX-50, H⁺-форма). Анализировали ТСХ в системе В. Получили 1.1 г (34.7%) соединения (Vb) в виде белого кристаллического вещества. λ_{\max} 267 нм. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): 11.31 (1 H, с, COOH), 8.05 (1 H, с, 1, H6), 6.30 (1 H, м, H1'), 5.68 (1 H, с, 3'-OH), 4.44 (1 H, д, J 4.4, H4'), 4.29 (1 H, м, H3'), 2.12 (1 H, м, H2'_a), 1.95 (1 H, м, H2'_b), 1.76 (3 H, с, CH₃).

(2'R)-1-(2,3-Дигидрофуран-2-ил)тимин (VIb). Раствор 0.90 г (3.51 ммоль) соединения (Vb) в 37.5 мл DMF нагревали до 100–110°C, добавляли к нему 2.0 г (11.25 ммоль) *N,N*-диметилформамиддинеопентацетата и перемешивали в течение 3–5 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали досуха в вакууме. Остаток растворяли в воде и экстрагировали хлороформом (3 × 30 мл). Органический слой отделяли и высушивали над сульфатом магния. Продукт выделяли при помощи хроматографии на силикагеле (колонка 2.5 × 14 см), элюируя 3%-ным раствором метанола в хлороформе. После упаривания получили 0.64 г (94%) соединения (VIb) в виде белого кристаллического вещества. Анализировали ТСХ в системе А. λ_{\max} 267 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 9.08 (1 H, с, NH), 7.05 (1 H, с, H6), 6.77 (1 H, м, H5'), 6.49 (1 H, д, J 2.15, H2'), 5.16 (1 H, м, H4'), 2.56–3.25 (2 H, м, H3'), 1.94 (3 H, с, CH₃).

(2'R,3'S,5'R)-1-(2-Диэтоксифосфиноилметокси-3-йодтетрагидрофуран-5-ил)тимин (VIIb). К раствору 0.50 г (2.60 ммоль) соединения (VIb) в 4 мл хлористого метилена добавляли 0.87 г (6.38 ммоль) диэтил(гидроксиметил)фосфоната при –25°C, а затем при перемешивании в течение 5 мин по каплям добавляли 0.70 г (3.48 ммоль) IVг, растворенного в 5.8 мл хлористого метилена. Смесь перемешивали при –25°C в течение 50 мин. Затем добавляли 30 мл хлороформа и 50 мл насыщенного водного раствора NaHCO₃. Органический слой отделяли, промывали водным раствором Na₂S₂O₃, высушивали над сульфатом магния. Продукт выделяли при помощи хроматографии на силикагеле (колонка 2.5 × 14 см), элюируя 3%-ным раствором метанола в

хлороформе. Анализировали ТСХ в системе А. После упаривания получили 1.01 г (92%) соединения (VIIb) в виде бесцветного масла. λ_{\max} 267 нм. ¹H-ЯМР (CDCl₃): 8.45 (1 H, с, NH), 7.36 (1 H, с, H6), 6.79 (1 H, т, J 7.16, H5'), 5.40 (1 H, с, H2'), 4.35 (1 H, м, H3'), 4.21 (4 H, м, CH₂ (Et)), 4.00 (1 H, м, PCH_a), 3.80 (1 H, м, PCH_b), 2.63 (2 H, дд, J 3.42, 7.16, H2'), 1.99 (3 H, с, 5-CH₃), 1.37–1.32 (6 H, м, CH₃ (Et)). ³¹P-ЯМР (CDCl₃): 17.75 (с).

(2'R,5'R)-1-(5-Фосфонилметокси-2,5-дигидрофуран-2-ил)тимин (Ib). К раствору 0.50 г (1.09 ммоль) соединения (VIIb) в 1.9 мл DMF при комнатной температуре добавляли 0.914 г (6 ммоль) Me₃SiBr и перемешивали в течение суток. Реакционную смесь упаривали и, не выделяя продукта реакции, растворяли в 4 мл THF, затем при 50–60°C добавляли при перемешивании 0.254 г (1.6 ммоль) 1,8-дизабицикло[5.4.0]ундец-7-ена. Смесь перемешивали в течение 3.5 ч, затем упаривали, растворяли в хлороформе и экстрагировали водой. Водный слой отделяли, дальнейшую очистку проводили при помощи ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой. Продукт элюировали градиентом 0–0.2 М раствора бикарбоната аммония, упаривали, от примеси неорганических солей продукт освобождали при помощи обращенно-фазовой хроматографии. Анализировали ТСХ в системе А. Получили 0.229 г (70%) соединения (Ib) в виде белого кристаллического вещества. λ_{\max} 267 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 7.33 (1 H, с, H6), 6.78 (1 H, с, H5'), 6.37 (1 H, д, J 6.0, H4'), 6.16 (1 H, д, J 6.0, H3'), 5.83 (1 H, с, H2'), 3.81 (1 H, дд, J 9.34, 13.08, PCH_a), 3.67 (1 H, дд, J 9.35, 13.08, PCH_b), 1.79 (3 H, с, CH₃). ³¹P-ЯМР (D₂O): 15.39 (с).

(β,γ-Дихлорметилен)дифосфорил-(2'R,5'R)-1-(5-фосфонилметокси-2,5-дигидрофуран-2-ил)тимин (Ie). Активацию соединения (Ib) (0.42 г, 0.14 ммоль) CDI в DMF (2.5 мл) проводили как описано ранее [15]. Затем к смеси добавляли раствор 0.19 г (0.56 ммоль) бис(трибутиламмоний)дихлорметилендифосфата в 1.5 мл DMF и перемешивали в течение суток, после чего реакционную смесь растворяли в воде. Продукт выделяли при помощи ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-Toyorearl. Продукт элюировали в градиенте концентрации 0–0.5 М раствора бикарбоната триэтиламмония. Анализировали ТСХ в системе В. Получили 0.016 г (36%) соединения (Ie). λ_{\max} 267 нм. ¹H-ЯМР (D₂O): 7.32 (1 H, с, H6), 6.76 (1 H, с, H5'), 6.39 (1 H, д, J 6.0, H4'), 6.12 (1 H, д, J 6.0, H3'), 5.90 (1 H, с, H2'), 3.99–3.87 (2 H, м, PCH₂), 1.79 (3 H, с, CH₃). ³¹P-ЯМР (D₂O): 8.71 (1 P, д, J 34.1, P^α), 7.79 (1 P, д, J 18.3, P^β), –0.43 (1 P, дд, J 18.3, 34.1, P^β).

(β,γ-Имидо)дифосфорил-(2'R,5'R)-1-(5-фосфонилметокси-2,5-дигидрофуран-2-ил)тимин (If). К раствору 0.67 г (0.13 ммоль) триэтиламмониевой соли соединения (Ib) в 2.5 мл DMF добавляли 0.086 г (0.53 ммоль) CDI и перемешивали в течение 5 ч. Затем добавляли 0.1 мл метанола, перемешивали 25 мин и упаривали под вакуумом до

минимального объема. После добавления к смеси 0.285 г (0.52 ммоль) раствора бис(трибутиламмоний)имидодифосфата в 3 мл DMF выпадал белый осадок. Реакционную смесь перемешивали в течение суток, затем добавляли воду (100 мл) и отфильтрованный раствор наносили на колонку с DEAE-Toyopearl. Продукт элюировали в градиенте концентрации (0–0.5 М) раствора бикарбоната триэтиламмония. Анализировали ТСХ в системе В. Получили 0.024 г (39%) соединения (**II**). λ_{\max} 267 нм. ^1H -ЯМР (D_2O): 7.31 (1 H, с, H6), 6.77 (1 H, с, H5'), 6.38 (1 H, д, J 6.0, H4'), 6.13 (1 H, д, J 6.0, H3'), 5.88 (1 H, с, H2'), 3.92–3.85 (2 H, м, PCH_2), 1.79 (3 H, с, CH_3). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 8.48 (1 P, д, J 27.0, P^α), 0.27 (1 P, с, P^γ), –12.41 (1 P, д, P^β).

(2'R,5'R)-1-(5-Фосфонилметокситетрагидрофуран-2-ил)тимин (X). 25 мг соединения (**Ib**) гидрировали в 3 мл 75%-ного водного этанола в присутствии 10 мг 10%-ного Pd/C. Спустя 7 ч реакционную смесь пропускали через колонку с Dowex 50 в NH_4 -форме, упаривали и получали 20 мг (80%) соединения (X). Анализировали ТСХ в системе В. λ_{\max} 267 нм. ^1H -ЯМР (D_2O): 7.56 (1 H, с, H6), 6.3 (1 H, м, H5'), 5.21 (1 H, м, H2'), 3.63 (2 H, м, PCH_2), 2.03–2.33 (4 H, м, H3' + H4'), 1.83 (3 H, с, 5- CH_3). ^{31}P -ЯМР (D_2O): 14.56 (с).

Ферменты и ДНК. В работе использовали следующие ферменты: Т4-полинуклеотидкиназу (Amersham Pharmacia Biotech), ДНК-полимеразу *E. coli*, фрагмент Кленова [КФ 2.7.7.7] (Boehringer Mannheim), обратную транскриптазу ВИЧ [КФ 2.7.7.49] (Worthington) и обратную транскриптазу ВМП [КФ 2.7.7.49] (Promega). ДНК-полимеразы α и β были выделены из плаценты человека как описано в работах [21, 22] соответственно. В работе использовали poly(rA)-(dT)₁₀ (Calbiochem). Одноцепочечную ДНК фага M13mp10 выделяли из культуральной жидкости реципиентного штамма *E. coli* K12XL1 как описано ранее [23]. Для односубстратных реакций, катализируемых перечисленными выше ДНК-полимеразами, использовали два вида праймер-матричных комплексов – ДНК – 14А и ДНК – 14Т – в зависимости от того, какое нуклеиновое основание (аденин или тимин) содержал тестируемый аналог dNTP. Тетрадекануклеотидные праймеры 14А и 14Т фирмы “Литех” (Россия) использовали без дополнительной очистки. Праймеры метили по 5'-концу по методу [24], используя [γ - ^{32}P]АТР и Т4-полинуклеотидкиназу с последующей инактивацией фермента (10 мин при 65°C). Праймер-матричные комплексы получали, инкубируя 5'-меченые праймеры с ДНК в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl, рН 8.0, и 5 мМ MgCl_2 , при 65°C в течение 10 мин и охлаждая до 30°C в течение 1 ч. Комплексы освобождали от свободного [γ - ^{32}P]АТР, пропуская растворы через колонку объемом 1 мл с Biogel A-1.5m в 10 мМ Трис-НСl-буфере, рН 7.6, содержащем 1 мМ EDTA. Содержащие праймер-матричный комплекс фракции

объединяли, хранили при –20°C и использовали в реакциях без дополнительной очистки.

Реакции синтеза ДНК. Для ФК ДНК-полимеразы I реакционная смесь для односубстратной реакции содержала в объеме 6 мкл 10 мМ Трис-НСl, рН 7.9, 5 мМ MgCl_2 , 1 мМ DTT, 0.3 ед. акт. фермента, 10 нМ праймер-матричный комплекс и тестируемые соединения в различных концентрациях; реакцию проводили в течение 15 мин при 25°C. В случае ОТ ВИЧ и ОТ ВМП реакционная смесь в 6 мкл содержала 10 мМ Трис-НСl, рН 8.2, 5 мМ MgCl_2 , 40 мМ KCl, 1 мМ DTT, 1 ед. акт. фермента, 20 нМ праймер-матричный комплекс и соответствующие субстраты; смесь инкубировали 30 мин при 37°C. Для ДНК-полимеразы α реакционная смесь в объеме 6 мкл содержала 10 мМ Трис-НСl, рН 7.4, 6 мМ MgCl_2 , 0.4 мМ DTT, 1 ед. акт. фермента, 20 нМ праймер-матричный комплекс и соответствующие субстраты; смесь инкубировали 20 мин при 37°C. В случае ДНК-полимеразы β инкубационная смесь в 6 мкл содержала 10 мМ Трис-НСl, рН 8.5, 5 мМ MgCl_2 , 0.1 мМ DTT, 1 ед. акт. фермента, 20 нМ праймер-матричный комплекс и соответствующие субстраты; смесь инкубировали 20 мин при 37°C. Во всех случаях реакции останавливали, добавляя к пробам по 3 мкл деионизованного формамида, содержащего 20 мМ EDTA и по 0.1% красителей (бромфенолового синего и ксиленцианола). Пробы выдерживали 2 мин при 100°C и продукты реакций разделяли электрофорезом в денатурирующем 14%-ном или 20%-ном полиакриламидном геле. Экспонирование гелей с рентгеновской пленкой Retina RX проводили при –20°C.

Количественную оценку скорости реакций и расчет кинетических констант проводили как описано в работе [25]. Константы Михаэлиса и V_{\max} в односубстратных реакциях, катализируемых ОТ ВИЧ, определяли графическим методом Лайнуивера–Бэрка. Оптимальными условиями реакции были следующие: 3 нМ комплекс ДНК-праймер 14А, 0.2 ед. акт. фермента, 5 мин при 37°C в объеме 6 мкл. Средние значения K_m для исследуемых соединений получали по данным трех независимых экспериментов.

Ингибирование модифицированными изостерными аналогами d₄TTP включения радиоактивной метки в ДНК. Способность соединений (**IId**), (**IIf**) и (**IIe**) ингибировать катализируемое ОТ ВИЧ включение [^3H]dTTP в poly(rA) – oligo(dT) определяли в условиях, описанных ранее [26]. Реакционная смесь в 10 мкл содержала 10 мМ Трис-НСl, рН 8.2, 5 мМ MgCl_2 , 40 мМ KCl, 1 мМ DTT и 2 мкМ (2 мкКи) [^3H]dTTP, 150 нг/мл poly(rA) – oligo(dT), 1 ед. акт. фермента и тестируемые соединения. Смесь инкубировали в течение 10 мин при 37°C. Реакцию останавливали, добавляя EDTA до конечной концентрации 0.1 М. Пробы переносили на фильтры GF/C, предварительно пропитан-

ные раствором 5%-ной ТСА. Фильтры пятикратно промывали раствором 5%-ной ТСА, один раз спиртом, высушивали и измеряли их радиоактивность в толуоловом сцинтилляторе с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика радиоактивности фирмы "Intertechnique" (Франция).

Работа выполнена при частичной поддержке грантом Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kukhanova M., Krayevsky A., Prusoff W., Cheng Y.C. // *Curr. Pharm. Des.* 2000. V. 6(5). P. 585–598.
2. Cheng Y.C., Dutschman G.E., Bastow K.F., Sarngadharan M.G., Ting R.Y. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262(5). P. 2187–2189.
3. Ferrin L.J., Mildvan A.S. // *Biochem.* 1986. V. 25(18). P. 5131–5145.
4. Arzumanov A.A., Semizarov D.G., Victorova L.S., Dyatkina N.B., Krayevsky A.A. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271(40). P. 24389–24394.
5. Dyatkina N.B., Shirokova E.A., Theil F., Roberts S.M., Krayevsky A.A. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996. V. 6(22). P. 2639–2642.
6. Martynov B.I., Shirokova E.A., Jasko M.V., Victorova L.S., Krayevsky A.A. // *FEBS Lett.* 1997. V. 410. P. 423–427.
7. Singh A.K., Varma R.S. // *Tetrahedron Lett.* 1992. V. 33(17). P. 2307–2310.
8. Schmidt R.R., Schloz U., Schwille D. // *Chem. Ber.* 1968. V. 101. P. 590.
9. Harmon R.E., Zenarosa C.V., Gupta S.K. // *Chem. and Ind.* 1969. V. 33. P. 1141–1145.
10. Moss G.P., Reese C.B., Schofield K., Shapiro R., Todd A.R. // *J. Chem. Soc.* 1971. P. 1149–1152.
11. Heyns K., Paulsen D.H. // *Angew. Chem.* 1967. V. 69(18/19). P. 600–608.
12. Ashby E.C., Goel A.B. // *J. Org. Chem.* 1981. V. 46. P. 3936–3938.
13. Kim C.U., Luh B.Y., Martin J.C. // *J. Org. Chem.* 1991. V. 56(8). P. 2642–2647.
14. Jones A.S., Williamson A.R., Winkley M. // *Carbohydrate Res.* 1965. V. 1. P. 187–195.
15. Ramler D.H., Yengoyan L., Paul A.V., Vax P.C. // *Biochem.* 1967. V. 6(6). P. 1828–1837.
16. Kim C.U., Luh B.Y., Martin J.C. // *J. Org. Chem.* 1991. V. 56(8). P. 2642–2647.
17. Khandazhiskaya A.L., Shirokova E.A., Skoblov Yu.S., Victorova L.S., Goyunova L.Y., Beabealashvili R.Sh., Pronyaeva T.R., et al. // *J. Med. Chem.* 2002. V. 45(6). P. 1284–1291.
18. Dyatkina N., Minassian S., Kukhanova M., Krayevsky A., von Janta-Lipinsky M., Chidgeavdze Z., Beabealashvili R. // *FEBS Lett.* 1987. V. 219(1). P. 151–155.
19. Викторова Л.С., Арзуманов А.А., Широкова Е.А., Ясько М.В., Александрова Л.А., Шипицын А.В., Скоблов А.Ю., Краевский А.А. // *Молекуляр. биология.* 1998. Т. 32(1). С. 162–171.
20. Дяткина Н.Б., фон Янта-Липински М., Минасян Ш.Х., Куханова М.К., Краевский А.А., Чиджавадзе З.Г., Бибилашвили Р.Ш. // *Биоорган. химия.* 1987. Т. 13(10). С. 1366–1374.
21. Мозжерин Д.Ю., Атражев А.М., Куханова М.К. // *Молекуляр. биология.* 1992. Т. 26(5). С. 999–1010.
22. Колочева Т.И., Невинский Г.А. // *Молекуляр. биология.* 1993. Т. 27(6). С. 1368–1379.
23. Краев А.С. // *Молекуляр. биология.* 1988. Т. 22(5). С. 1164–1197.
24. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd Edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. P. 5.68–5.72.
25. Skoblov A.Yu., Sosunov V.V., Victorova L.S., Skoblov Yu.S., Kukhanova M.K. // *Russ. Bioorgan. Chem.* 2005. Т. 31(1). С. 54–64. (Скоблов А.Ю., Сосунов В.В., Викторова Л.С., Скоблов Ю.С., Куханова М.К. // *Биоорган. химия.* 2005. Т. 31(1). С. 54–64.)
26. Mitsuya H., Broder S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83(6). P. 1911–1915.

Isosteric Triphosphonate Analogues of dNTP: Synthesis and Substrate Properties toward Various DNA Polymerases

A. Yu. Skoblov^a, A. N. Semenyuk^b, A. M. Murabuldaev^c, V. V. Sosunov^d,
L. S. Viktorova^b, and Yu. S. Skoblov^{a, #}

[#] Phone: +7 (495) 330-6947; e-mail: sur@ibch.ru

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

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

^c OOO Vysokie Tekhnologii, Moscow, Russia

^d GU Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russia

Isosteric triphosphonate derivatives of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydroadenosine and 3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine and their β, γ -substituted analogues were synthesized. Their substrate properties toward a number of reverse transcriptases of the human immunodeficiency and bird myeloblastosis viruses, human DNA polymerases α and β , and the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I were studied. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2007, vol. 33, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: isosteric analogues of dNTP, substrate properties; human DNA polymerases; HIV and bird myeloblastosis reverse transcriptases; Klenow fragment