



УДК 577.152.277'135

© 1991 г.

А. А. Южаков, З. Г. Чиджавадзе, Р. Ш. Библиашвили,
 А. А. Краевский*, Г. А. Галегов**, М. Н. Борнзева**,
 Д. П. Посик**, Т. Ю. Килессо**

3'-МЕРКАПТО-3'-ДЕЗОКСИТИМИДИН-5'-ТРИФОСФАТ КАК ТЕРМИНАТОР СИНТЕЗА ДНК, КАТАЛИЗИРУЕМОГО РНК-ЗАВИСИМЫМИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ

Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР, Москва;

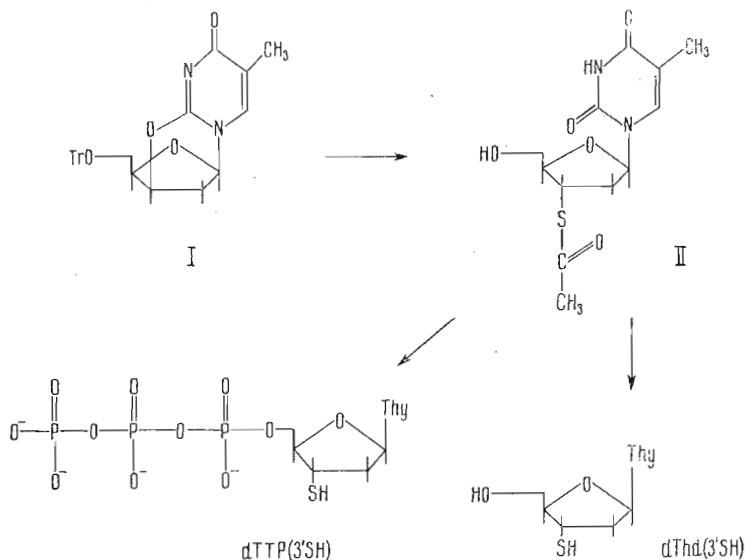
* Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта АН СССР, Москва;

** Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР, Москва

Синтезированы 3'-меркапто-3'-дезокситимидин и его 5'-трифосфат. Изучены субстратные свойства нуклеотида в бесклеточных системах с ДНК-полимеразой из тимуса телянка, ДНК-полимеразой I из *E. coli* (фрагмент Кленова), концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (из тимуса телянка) и обратными транскриптазами из вирусов AMV и HIV-I. Показано, что данное соединение селективно и необратимо терминирует элонгацию ДНК обратной транскриптазой. Однако для других ДНК-полимераз, используемых в работе, этот аналог нуклеотида субстратных свойств не проявил. Изучены противовирусные свойства dThd(3'SH) на лимфобластоидной линии клеток, инфицированных HIV. Показано подавление вируса на данной культуре клеток с той же эффективностью, что и у 3'-азидо-3'-дезокситимидина.

Селективные ингибиторы ДНК-полимераз различной природы представляют большой интерес для изучения ферментативных систем *in vitro*, изучения их биологической функции в клетке, а также для возможного поиска противовирусной активности среди данных соединений. Было продолжено изучение аналогов, модифицированных по 3'-положению сахарного остатка нуклеотидов [1]. Мы синтезировали dThd(3'SH) и испытали его на противовирусную активность, а его 5'-трифосфат был изучен в системах с различными полинуклеотидсинтезирующими ферментами.

Синтез. В работе [2] указывалось на попытку синтеза dThd(3'SH) из 3'-метансульфонил-ксило-тимидина с солью тиоуксусной кислоты, однако авторам не удалось избежать димеризации.



Сокращения: dThd(3'SH), dTTP(3'SH) — 3'-меркапто-3'-дезокситимидин и его 5'-трифосфат; dThd(3'N₃), dTTP(3'N₃) — 3'-азидо-3'-дезокситимидин и его 5'-трифосфат; HIV (Human Immunodeficiency Virus) — вирус иммунодефицита человека; AMV (Avian Myeloblastosis Virus) — вирус миелобластозы птиц; I — 3'-азидо-2,3'-дигидротимидин; II — 3'-тиоацетилтимидин.

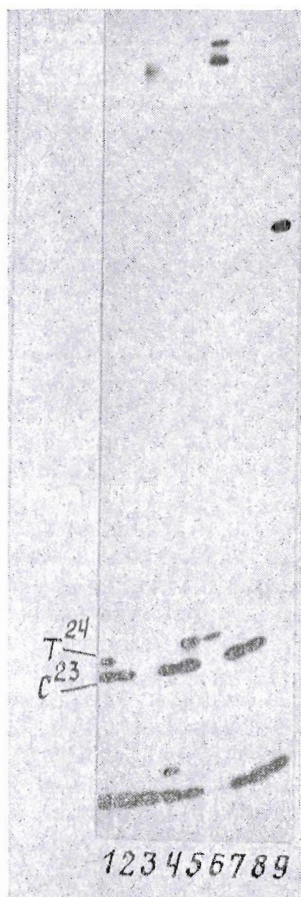


Рис. 1

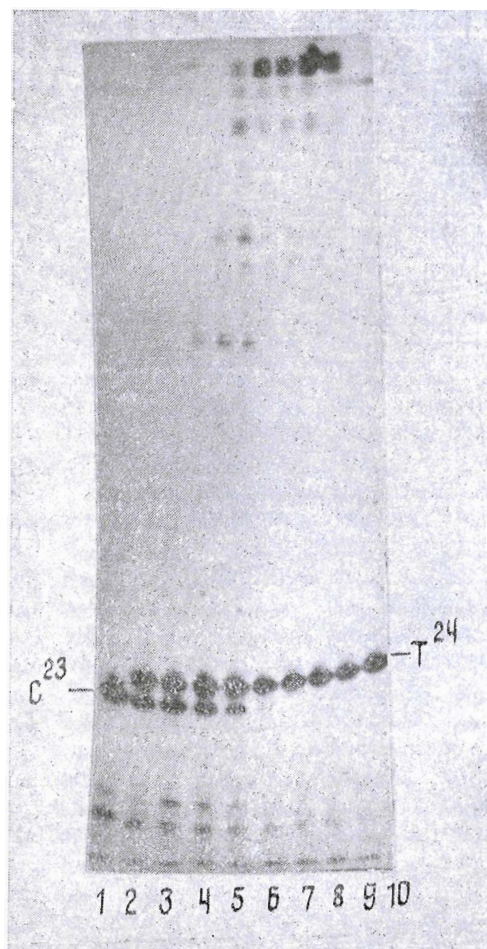


Рис. 2

Рис. 1. Электрофореграмма ДНК, синтезированной ДНК-полимеразой *E. coli* (фрагментом Кленова) (1–3), обратной транскриптазой AMV (4–6), ДНК-полимеразой α (7–9). 1, 4, 7 — синтез из dATP, dGTP и dCTP (10 мкМ каждый); 2, 5, 8 — то же, но в присутствии 200 мкМ dTTP (3'SH); 3, 6, 9 — реакция угона в присутствии четырех природных dNTP (250 мкМ каждый), добавляемых после того, как реакции, показанные на треках 2, 5, 8, были закончены. Время синтеза и реакции угона составляло соответственно для ДНК-полимеразы *E. coli* 5 и 5 мин, для обратной транскриптазы AMV и ДНК-полимеразы α 60 и 30 мин. Нуклеотидная последовательность продукта — GTAAACGACCCCGGCCAGT²⁰ACCTTGGGTGCAGGT³⁰ (праймер подчеркнут)

Рис. 2. Элонгация цепей ДНК, терминированных с dTTP (3'SH), с помощью обратной транскриптазы. ДНК была синтезирована в присутствии dATP, dGTP, dCTP, как на рис. 1, трек 4, в течение 60 мин с 200 мкМ dTTP (3'SH) (1), как на рис. 1, трек 5, в течение 60 мин (2). После синтеза ДНК, как на треке 2, были добавлены четыре природных dNTP (250 мкМ каждый) и инкубация была продолжена в течение дополнительных 0,5 (3), 1 (4), 2 (5), 5 (6), 10 (7), 15 (8), 30 (9) и 60 мин (10)

Мы в качестве исходного соединения для синтеза 3'-тиоацетилтимидина(II) выбрали 5'-третил-3',2-ангидротимидин (I) (схема). Раскрытие ангидроцикла в производном (I) проводили действием калиевой соли тиоуксусной кислоты в среде DMF. При этом выход соединения (II) составил 42%. Аммонолиз тиоацетата (II) раствором NH₃ в метаноле за 5 мин приводил к dThd(3'SH), строение которого доказано данными ПМР-спектра (отсутствует синглет CH₃CO-группы при 2,39 м.д.) и анализом на присутствие свободной SH-группы методом Эллмана [3].

Для получения 5'-трифосфата dThd(3'SH) из нуклеозиды (II) мы использовали метод [4]. После удаления ацетильной защиты и ионо-

Жизнеспособность клеток MT-4, инфицированных HIV, при различных концентрациях dThd(3'SH) и dThd(3'N₃)

Количество нуклеозидного аналога, которое внесли в лунку (концентрация в инкубационном растворе)	Жизнеспособность клеток (%) за			
	5 сут		7 сут	
	dThd(3'SH)	dThd(3'N ₃)	dThd(3'SH)	dThd(3'N ₃)
Клетки с вирусом				
100 мкМ (13,5 мкМ)	72	82	59	79
20 мкМ (2,7 мкМ)	53	66	36	74
5 мкМ (0,7 мкМ)	30	57	23	62
Клетки без вируса	—	88*	—	74*
Клетки с вирусом	—	32*	—	20*
Клетки без вируса	80	—	74	—
100 мкМ (13,5 мкМ)				

* В отсутствие аналогов.

обменной хроматографии методом Эдмана доказано наличие в полученном соединении свободной 3'-SH-группы, а методом Васьяковского [5] — наличие 5'-трифосфата.

Субстратные свойства dTTP(3'SH) по отношению к ДНК-полимеразе α из тимуса теленка, ДНК-полимеразе I из *E. coli* (фрагмент Кленова), обратной транскриптазе вируса HIV-I и концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазе из тимуса теленка исследованы в условиях, описанных в «Экспериментальной части». На фотографиях электрофорограмм показан синтез ДНК в присутствии 200 мкМ dTTP(3'SH) и dATP, dGTP, dCTP (рис. 1). Ни ДНК-полимераза α , ни ДНК-полимераза I из *E. coli* не использовали dTTP(3'SH) в качестве субстрата (треки 1, 2 и 7, 8). Ферментативный синтез не терминируется этим соединением, что видно из реакции угона (треки 3, 9), когда после инкубации с dTTP(3'SH) добавлялись все четыре dNTP. Концевая дезоксирибонуклеотидилтрансфераза также не использует данный аналог как субстрат (не показано). Обратная транскриптаза AMV может присоединять dTTP(3'SH) к 3'-концу цепи ДНК (треки 4, 5). Такое присоединение необратимо и терминирует рост цепи ДНК. Это хорошо видно для T²⁴-полосы (ср. треки 3—10, рис. 2), которая в отличие от C²³-полосы не исчезает при реакции угона. Надо признать, что в сравнении с другими терминаторами, изученными в аналогичных системах для обратной транскриптазы AMV [6], терминаторные свойства dTTP(3'SH) проявляются значительно меньше. Тем не менее ингибирующие действия синтеза ДНК с dTTP(3'N₃) и dTTP(3'SH) оказались вполне сравнимы для обратной транскриптазы AMV. Ингибирующие концентрации аналогов составили 12 мкМ для dTTP(3'N₃) [6] и 16 мкМ для dTTP(3'SH). В то же время для обратной транскриптазы вируса HIV ингибирующие концентрации тех же аналогов составили 0,24 и 24 мкМ соответственно.

Противовирусные свойства dThd(3'SH) и dThd(3'N₃) изучали, используя перевиваемую лимфобластодную Т-клеточную линию MT-4, чувствительную к инфицированию HIV-I [7]. В таблицу сведены данные по жизнеспособности клеток, инфицированных вирусом при различных концентрациях препаратов dThd(3'SH) и dThd(3'N₃).

Как следует из таблицы, dThd(3'SH) увеличивает жизнеспособность MT-4-клеток при концентрации 13,5 мкМ до 72% вместо контрольных 32%; видна также его низкая цитотоксичность (80% в его присутствии против 88% в контроле за 5 сут, 74% в его присутствии и 74% в контроле за 7 сут). Из таблицы также видно, что противовирусное действие dThd(3'SH) не уступает действию dThd(3'N₃) (разница в значениях лежит в пределах ошибки опыта).

Экспериментальная часть

ТСХ проводили на стандартных пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системе СНСl₃ — MeOH (9 : 1 по объему). Адсорбционную колонную хроматографию выполняли на силикагеле L 40/100 (Chemapol,

ЧСФР), для ионообменной хроматографии использовали DEAE-Toyopearl 650M (Toyo Soda, Япония). ВЭЖХ проводили на приборе Gilson (Франция). Анализ нуклеозидов осуществляли на колонке Ultrasphere ODS (4,6 мм × 25 см) с размером частиц сорбента 5 мкм. Элюцию соединений проводили после 5 мин в изократическом режиме воды линейным градиентом концентрации 0—60% CH₃CN в воде в течение 40 мин при скорости потока 1 мл/мин.

УФ-спектры снимали в метаноле и воде на спектрофотометре Yanaco UO-2000 (Япония), ¹H-ЯМР-спектры — на спектрометре WM-500 (Bruker, ФРГ) в CDCl₃ или CD₃OD с тетраметилсилианом в качестве внутреннего стандарта (значения даны в м.д., J — в Гц; условные обозначения: с — сплитт, д — дублет, дд — дублет дублетов, к — квартет, м — мультиплет). Элементный анализ проводили на CHNOS-1106 Carlo-Erva (Италия).

3'-Азидо-3'-дезокситимидин (*dThd(3'N₃)*) был получен по методике [8].

Тиоуксусная кислота (Merck, ФРГ) была перегнана и нейтрализована 3 М КОН до pH 7,0. Полученная соль перекристаллизована из этанола (т. пл. > 280° С с разл.).

5'-о-Тритил-2,3'-ангидротимидин (I) был синтезирован и по данным ВЭЖХ, ТСХ, а также по спектрам ПМР и УФ идентичен описанному в литературе [9].

3'-Тиаоацетил-3'-дезокситимидин (II). К раствору 3 г (6,02 ммоль) 5'-тритил-2,3'-ангидротимидина в 100 мл DMF добавляли 7 г (60 ммоль) ангидропроизводного (I). Смесь перемешивали 4 ч при 110—140° С, контролируя ход реакции по ТСХ. DMF упаривали в вакууме, остаток растворяли в хлороформе и промывали водой (3 × 300 мл), хлороформный экстракт высушивали сульфатом натрия и хроматографировали на колонке (10 × 15 см) с силикагелем в системе хлороформ — метанол (линейный градиент метанола от 0 до 5%). 5'-Тритил-3'-тиаоацетил-3'-дезокситимидин упаривали в вакууме и обрабатывали 80% уксусной кислотой (100 мл, 20 ч при комнатной температуре), упаривали в вакууме и хроматографировали на колонке (10 × 15 см) с силикагелем (линейный градиент метанола — от 0 до 10%). Продукт, имеющий при ТСХ R_f 0,70, очищали ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS, собирая фракцию с временем удерживания 35 мин. Выход 0,758 г (42%). Найдено, %: С 48,11; Н 5,42; N 9,56; S 10,55. C₁₂H₁₆N₂O₅S. Вычислено, %: С 47,99; Н 5,37; N 9,33; S 10,67. ¹H-ЯМР: 7,85 к (1H, J 1,0, H6), 6,13дд (1H, J 6,5 и 6,5, H1'), 4,04—3,67 м (4H, H4', H3', H5'a, H5'b), 2,46м (2H, H2'a, H2'b), 2,39с (3H, CH₃COS—), 1,93 д (3H, J 1,0, 5-CH₃).

3'-Меркапто-3'-дезокситимидин (*dThd(3'SH)*). 0,758 г (2,5 ммоль) тиаоацетата (II) в 100 мл 8% аммиака в метаноле перемешивали 5 мин при комнатной температуре и упаривали в вакууме. Образец растворяли в метаноле, фильтровали и хроматографировали на колонке Ultrasphere ODS. Время удерживания 38 мин. Выход 0,5 г (90%). Найдено, %: С 46,58; Н 5,51; N 10,70; S 12,32. C₁₀H₁₄N₂O₄S. Вычислено, %: С 46,50; Н 5,46; N 10,85; S 12,41. ¹H-ЯМР: 7,90д (1H, J 1,0, H6), 6,16дд (1H, J 4,6 и 6,7, H1'), 4,01м (1H, H4'), 3,94—3,82м (2H, H5'a, H5'b), 3,67м (1H, H3'), 2,55—2,50м (2H, H2'a, H2'b), 1,88д (3H, J 1,0, 5-CH₃). УФ-спектр (метанол): λ_{max} 264 нм (ε 9800).

3'-Меркапто-3'-дезокситимидин-5'-трифосфат (*dTTP(3'SH)*). В смесь, содержащую 60 мг (0,2 ммоль) тиаоацетата (II) и 0,7 мкл триметилфосфата, добавляли 50 мл POCl₃ и перемешивали 12 ч при 0° С, контролируя ход реакции по ТСХ. Добавляли при 0° С 2 мл 0,5 М раствора бис-три-*n*-бутиламмоний-пирофосфата в DMF и 0,2 мкл трибутиламина, тщательно встряхивали в течение 1 мин, после чего смесь выливали в 20 мл 0,2 М раствора триэтиламмонийбикарбоната в воде (pH 7,5). Раствор упаривали в вакууме, добавляли 100 мл 8% аммиака в MeOH, оставляли на 5 мин при комнатной температуре и упаривали в вакууме. Полученный остаток хроматографировали на колонке (5 × 10 см) с DEAE-Toyopearl 650 M в линейном градиенте соли от 0 до 0,5 М триэтиламмонийбикарбоната. Фракцию, содержащую dTTP(3'SH), упаривали в вакууме, снова упаривали с водой (3 × 10 мл) и высушивали. Выход 100 мг (54%). После

обработки небольшого количества dTTP(3'SH) щелочной фосфатазой из селезенки полученный нуклеозид имел хроматографические и спектральные характеристики, идентичные dThd(3'SH).

Ферменты. ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова; удельная активность 20000 ед./мг, КФ 2.7.7.7) была любезно предоставлена Л. П. Савочкиной (ВКНЦ АМН СССР).

ДНК-полимераза α (КФ 2.7.7.7) и концевая дезоксирибонуклеотидил-трансфераза из тимуса телянка (КФ 2.7.7.31) были выделены модифицированными методами Гросса с сотрудниками [10] и Боллума [11]. Удельная активность ферментов составляла 5000 ед./мг. Обратная транскриптаза из AMV (КФ 2.7.7.49, удельная активность 12 ед./мкл) была любезно предоставлена А. А. Шевелевым (ВКНЦ АМН СССР).

ДНК. dGTAAACGACGGCCAGT — праймер, синтезированный Б. К. Черновым (Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва), метили по 5'-концу с помощью [γ - 32 P]АТФ и полинуклеотидкиназы по методу [12]. Олигонуклеотид был выделен на DE-52 и использовался для синтеза с матрицы ДНК фага M13mp10. dNTP (Sigma, США) были использованы без специальной очистки.

Электрофорез в полиакриламидном геле осуществлялся по методике [13].

Ферментативные реакции. Реакция синтеза ДНК, катализируемая обратной транскриптазой AMV, проводилась при 42° С в инкубационной смеси объемом 20 мкл, содержащей 35 мМ трис-НСl (рН 8,4), 6 мМ MgCl₂, 5 мМ 2'-меркаптоэтанол, 50 мМ NaCl, dАТФ, dGТФ и dСТФ (10 мкМ каждый), 0,1 мкг ДНК M13mp10 и эквимольное количество 5'- 32 P-меченого праймера. Реакция инициировалась добавлением 6 ед. акт. фермента. Концентрация нуклеотидного аналога и время реакции указаны в подписях к рисункам. Реакция, катализируемая ДНК-полимеразой I (фрагментом Кленова) из *E. coli* и ДНК-полимеразой α из тимуса телянка, проводилась при 37° С в инкубационной смеси объемом 20 мкл, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 5 мМ MgCl₂, 5 мМ 2'-меркаптоэтанол, dАТФ, dGТФ и dСТФ (10 мкМ каждый), 0,1 мкг ДНК M13mp10 и эквимольное количество 5'- 32 P-меченого праймера и 2 ед. акт. фрагмента Кленова или 4 ед. акт. ДНК-полимеразы α .

Ингибирование обратной транскриптазы HIV-I анализировали в стандартной poly(rA)-oligo(dT)-тест-системе [14]; в контроле использовали обратную транскриптазу AMV. Источником обратной транскриптазы HIV служил очищенный вирус HIV-I. Лимфобластоидную линию клеток H9/III В (Р. Галло, США) культивировали в среде RPMI-1640 с 15% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамина, 0,1 мг/мл гентамицина, 10 мМ HEPES. Вирус выделяли и очищали по методу [15]. Его разрушали в растворе, содержащем 15 мМ трис-НСl (рН 7,5), 150 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 5 мМ дитиотреит и 0,4% тритон X-100. Реакцию poly(dT)-синтеза проводили в объеме 25 мкл, содержащем 15 мМ трис-НСl (рН 8,5), 80 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 3 мМ дитиотреит, 0,3 мМ EDTA, 0,2 мкг/мл poly(A)-(dT₁₂₋₁₈)-комплекс, 1,25 мкКи 1 мкМ [3 H]dTTP (Amersham), 0,02% тритон X-100, нуклеотидные аналоги в соответствующих концентрациях. Реакцию инициировали добавлением 2,5—5 мкл вирусной суспензии или добавлением очищенной обратной транскриптазы AMV. После 60 мин инкубирования при 37° С пробы наносили на 1-мм бумагу ватман-1 и промывали 5% трихлоруксусной кислотой и 10 мМ натрийпирофосфатом в 1 М HCl. [3 H]dTTP, включенный в кислотонерастворимую часть, промывали в жидкостном сцинтиляторе в приборе SL-30 Intertechnique. Эффективность ингибитора определяли как концентрацию аналога, подавляющую на 50% включение [3 H]dTTP.

Испытание противовирусного действия dThd(3'SH) проводили, используя перевиваемую лимфобластоидную Т-клеточную линию MT-4 (полученную от проф. С. С. Маренниковой, Институт вирусных препаратов АМН СССР), чувствительную к инфицированию HIV-I [7]. Клетки MT-4 выращивали в виде суспензии в культуральной среде RPMI-1640

с 15% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 300 мкг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина в 10 мМ НЕРЕС-буфере. Для изучения нуклеозидов клетки MT-4 в концентрации 500 тыс. на лунку помещали в 24-луночную панель, затем вносили исследуемое вещество в концентрации 13,5; 2,7; 0,7 мкМ. Инфицирование проводили вирусосодержащим материалом, полученным с клеток-продуцентов HIV-I H9/III B, профильтрованным через фильтр, с диаметром пор 0,45 мкм (Millipore, США). Активность по отношению к обратной транскриптазе HIV в материале, используемом для заражения клеток MT-4, была не ниже 30000 змп./мин при объеме пробы 5 мкл. В контрольную лунку к клеткам MT-4 добавляли культуральную среду, не содержащую вирус.

Анализ цитопатического действия вируса на клетки MT-4 осуществляли через 5 и 7 сут после инфицирования. Подсчет клеток проводили в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего. Полученные данные по изучению dThd(3'SH), а также для dThd(3'N₃) в тех же условиях сведены в таблицу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chidgeavadze Z. G., Beabealashvilli R. Sh., Kravetsky A. A., Kukhanova M. K. // *Biochim. et biophys. acta*. 1986. V. 868. № 8. P. 145—152.
2. Herdewijn P., Balzarini J., Baba M., Pauwels R., Van Aerscohot A., Janssen G., De Clercq E. // *J. Med. Chem.* 1988. V. 31. № 10. P. 2000—2048.
3. Ellman G. L. // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1959. V. 82. № 10. P. 70.
4. Ótvos L., Soyo J., Kova's T. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. № 4. P. 1763—1777.
5. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. // *J. Chromatogr.* 1975. V. 114. № 5. P. 129—141.
6. Краевский А. А., Куханова М. К., Атражев А. М., Чиджавадзе З. Г., Бибилашвили Р. Ш. // Молекулярн. биология. 1987. Т. 21. № 1. С. 33—38.
7. Harada S., Kouyanagi Y., Yumamoto N. // *Science*. 1985. V. 229. № 20. P. 536—566.
8. Зайцева В. Е., Дяткина Н. Б., Краевский А. А., Скапцова Н. В., Турина О. В., Гнуцев Н. В., Готтих Б. П., Ажаев А. В. // *Биооргани. химия*. 1984. Т. 10. № 5. С. 670—680.
9. Fox J. J., Miller N. C. // *Org. Chem.* 1963. V. 28. № 5. P. 936—941.
10. Grosse F., Krauss G. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. № 8. P. 5470—5475.
11. Bollum F. J., Chang L. M. S., Triapolis C. H., Dorson J. W. // *Meth. Enzymol.* 1974. V. 24. № 2. P. 347—395.
12. Richardson P. J. // *Biochemistry*. 1977. V. 16. № 5. P. 5120—5126.
13. Laemmli U. K. // *Nature*. 1970. V. 227. № 2. P. 680—685.
14. Mitsuya H., Broder S. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. № 7. P. 1911—1915.
15. Hoffman A. P., Vanapour B., Levy J. A. // *Virology*. 1985. V. 147. № 1. P. 326—335.

Поступила в редакцию
28.VIII.1990

A. A. YUZHAKOV, Z. G. CHIDGEAVADZE, R. Sh. BEABEALASHVILLI, A. A. KRAYEVSKY *,
G. A. GALEGOV **, M. N. KORNEEVA, D. N. NOSIK **, T. Yu. KILESSO **

3'-MERCAPTO-3'-DEOXY-TTP TERMINATES DNA SYNTHESIS BY RNA-DEPENDENT DNA POLYMERASES

*National Cardiology Research Centre, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Moscow;*

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

*** D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow*

3'-Mercapto-3'-deoxy-TTP was synthesized and tested as DNA chain terminator nucleotide for calf thymus alfa DNA polymerase, *E. coli* DNA polymerase I (Klenow fragment), terminal deoxyribonucleotidyltransferase (Bollum enzyme) and reverse transcriptase from AMV- and HIV-I-viruses. It was shown that the compound terminates DNA chain elongation by reverse transcriptases selectively and irreversibly. Other tested DNA polymerases do not use this nucleotide analogue as a substrate. 3'-Mercapto-3'-deoxythymidine was tested on lymphoblastoid T-cell line MT-4 with HIV-viruses and shown to supresse viruses as efficiently as 3'-azido-3'-deoxythymidine.