



УДК 547.857.5'455.466'16'118.057:577.152.277'135

СИНТЕЗ 2',3'-ДИДЕЗОКСИ-3'-ФТОРАДЕНОЗИНА И ГУАНОЗИНА, ИХ 5'-ТРИФОСФАТОВ И ИЗУЧЕНИЕ 2',3'-ДИДЕЗОКСИ-3'-ФТОРНУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТОВ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ *

Квасюк Е. И., Зайцева Г. В., Савочкина Л. П.*, Чиджавадзе З. Г.*, Библиашвили Р. Ш.*, Ланген П.***, Михайлопуло И. А.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск;
* Всесоюзный кардиологический научный центр Академии медицинских наук СССР, Москва;

** Центральный институт молекулярной биологии Академии наук ГДР, Берлин-Бух

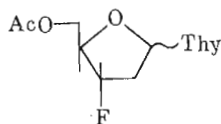
Осуществлен синтез 2',3'-дидезокси-3'-фтор-β-D-рибофуранозидов аденина и гуанина путем химического трансгликозилирования с использованием 5'-О-ацетил-2',3'-дидезокси-3'-фтортимидина и -уридина в качестве доноров углеводного фрагмента и перепилированных производных 6-N-бензоиладенина и 2-N-пальмитоилгуанина в качестве акцепторов соответственно.

Осуществлен синтез 5'-трифосфатов 2',3'-дидезокси-3'-фтор-аналогов тимидина, цитидина, аденозина и гуанозина, и изучены их свойства в качестве субстратов для ревертазы AMV и фрагмента Кленова.

Определена относительная эффективность включения dNTP(3'F) в цепь синтезируемой ДНК по сравнению с природными субстратами. Показано, что dGTP(3'F) — наиболее, а dATP(3'F) и dCTP(3'F) — наименее эффективные терминаторы синтеза ДНК как для обратной транскриптазы, так и для фрагмента Кленова.

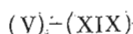
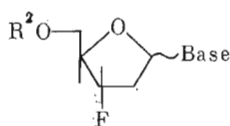
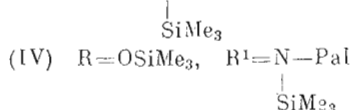
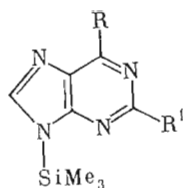
Недавно нами было показано [2], что dNTP(3'F) являются эффективными терминаторами биосинтеза ДНК рядом ДНК-полимераз, что позволило использовать их для установления первичной структуры фрагментов ДНК по методу Сэнгера и сотр. [3]. В настоящей работе описан синтез dAdo(3'F) и dGuo(3'F), их 5'-трифосфатов, а также проведена количественная оценка эффективности всех четырех dNTP(3'F) в качестве терминаторов цепи ДНК при синтезе ее такими ферментами, как ревертаза AMV и фрагмент Кленова.

Синтез dCTP(3'F) и dTTP(3'F) описан ранее [4].



(I) β-аномер
(II) α-аномер

* Предварительное сообщение см. [1]. Сокращения: TMS-Tf — триметилсилилтрифторметансульфонат; dNTP(3'F) — 2',3'-дидезокси-3'-фтор-β-D-рибофуранозил-5'-трифосфаты, содержащие в качестве гетероциклического основания тимин dTTP(3'F), цитозин dCTP(3'F), аденин dATP(3'F) и гуанин dGTP(3'F); dNMP(3'F) — соответствующие 5'-монофосфаты; dThd(3'F), dCyd(3'F), dAdo(3'F) и dGuo(3'F) — 2',3'-дидезокси-3'-фтор-β-D-рибофуранозилтимин, -цитозин, -аденин и -гуанин соответственно; фрагмент Кленова — ДНК-полимераза I *E. coli*, фрагмент Кленова (КФ 2.7.7.7); ревертаза AMV — обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц (КФ 2.7.7.49).



Соединение	Аномер	Base	R ²	Соединение	Аномер	Base	R ²
(V)	β	bzAde	Ac	(XIII)	β	palGua	H
(VI)	β	Ade	H	(XIV)	β	Gua	PO(OH) ₂
(VII)	β	Ade	PO(OH) ₂	(XV)	β	Gua	P ₃ O ₅ (OH) ₄
(VIII)	β	Ade	P ₃ O ₅ (OH) ₄	(XVI)	α	palGua	Ac
(IX)	α	bzAde	Ac	(XVII)	α	Gua	H
(X)	α	Ade	H	(XVIII)	α/β	palGua	Ac
(XI)	β	palGua	Ac	(XIX)	α/β	Gua	H
(XII)	β	Gua	H				

Pal=pal=CH₃(CH₂)₁₄CO (пальмитойл).

Синтез dAdo(3'F) и dGua(3'F) был осуществлен путем химического трансгликозилирования [5] с использованием 5'-O-ацетил-2',3'-дидезокси-3'-фтортимидина (I) в качестве донора углеводного фрагмента и персиллированных производных 6-N-бензоиладенина (III) и 2-N-пальмитойлгуанина (IV) в качестве акцепторов соответственно. В результате конденсации ацетата (I) с силилбензоиладенином (III) в ацетонитриле в присутствии TMS-Tf в качестве конденсирующего агента (молярное соотношение реагентов 1,05 : 2,3 : 1,0) хроматографией на силикагеле были выделены в индивидуальном состоянии исходный нуклеозид (I), его α-аномер (II), N⁹-β- и N⁹-α-гликозиды (V) и (IX) с выходами 9, 18, 26 и 26% соответственно. При использовании триметилсилильного производного 2-N-пальмитойлгуанина (IV) вместо (III) аналогичным образом были получены исходный нуклеозид (I) (10%), его α-аномер (II) (22%), N⁹-β-гликозид (XI) (24,5%) и N⁹-α-гликозид (XVI) (18%), а также смесь аномерных N⁷-гликозидов (XVIII) (23%), которую не удалось разделить на индивидуальные соединения. Аналогичные результаты были получены при использовании 5'-O-ацетил-2',3'-дидезокси-3'-фторуридина [4] в качестве донора углеводного фрагмента в реакции трансгликозилирования. В результате обработки соединений (V), (IX), (XI) и (XII) метанольным насыщенным раствором аммиака были получены соответствующие деблокированные нуклеозиды (VI), (X), (XII) и (XVII). Аналогичным образом была деблокирована смесь аномерных N⁷-гликозидов (XVIII), и при этом была получена смесь аномеров (XIX), в которой преобладал α-аномер.

Строение синтезированных соединений было подтверждено данными ¹H-ЯМР (табл. 1 и 2), УФ- и КД-спектроскопии. Отнесения резонансных сигналов были выполнены с использованием техники двойного резонанса, а также псевдоротационного анализа фуранозного кольца согласно данным работ [6, 7]. Для β-аномеров (I), (VI) и (XII) наиболее заселен-

Значения химических сдвигов (δ , м. д.) протонов в ¹H-ЯМР-спектрах соединений (I), (II), (VI), (X), (XII) и (XVII)

Соединение	δ -H (δ -H)	δ -Me (2-H)	1'-H	2'-a-H	2'-b-H	3'-H	4'-H	5'-a-H	5'-b-H	NH	NH ₂	Ac	OH
(I)	7,28д	1,92г	6,33дд	2,17м	2,68м	5,22дд	4,46тт	4,37дд	4,29дд	10,16с	—	2,13с	—
(II)	7,28д	1,93д	6,37дд	2,77м	2,43м	5,24дд	4,81дт	4,15м	4,15м	9,95с	—	2,12с	—
(VI)	8,28с	8,09с	6,35дд	2,98м	2,60м	5,39дд	4,20дт	3,58м	3,58м	7,33ус	7,30ус	—	5,05г
(X)	8,16с	8,11с	6,47дд	2,94м	2,78м	5,40дд	4,59дт	3,58м	3,49м	—	7,30ус	—	5,10г
(XII)	7,91с	—	6,16дд	2,79м	2,58м	5,38дд	4,16дд	3,53м	3,56м	10,64ус	6,48ус	—	5,45г
(XVII)	7,66с	—	6,23дд	2,81м	2,59м	5,35дд	4,50тт	3,53м	3,43м	—	6,43ус	—	4,99г

Значения констант спин-спинового взаимодействия (J , Гц) для соединений (I), (II), (VI), (X), (XII), (XVII)

Соединение	1', 2'a	1, 2'b	2'a, 2'b	2'a, 3'	2'b, 3'	3'a, 3'	4', 5'	4, 5'a	5'a, 5'b	F, 4'	F, 3'	F, 2'a	F, 2'b	Прочие
(I)	8,8	5,5	14,7	5,2	<0,5	<0,5	3,9	3,8	12,1	26,1	53,6	36,2	20,8	1,0 - CH ₃ , H-6
(II)	7,7	4,8	16,0	5,1	<0,5	<0,5	4,6	4,6	12,0	22,9	53,4	40,2	24,3	1,2 - CH ₃ , H-6
(VI)	9,3	5,9	14,6	4,5	<0,5	<0,5	4,4	4,4	~12	27,05	55,4	41,5	20,7	5,5 - OH, 5a, 5b, 5c, 5d, 5e, 5f, 5g, 5h, 5i, 5j, 5k, 5l, 5m, 5n, 5o, 5p, 5q, 5r, 5s, 5t, 5u, 5v, 5w, 5x, 5y, 5z
(X)	7,5	4,6	15,3	5,25	<0,5	<0,5	4,7	4,7	11,5	24,8	55,4	38,3	23,1	5,5 - OH, 5a, 5b, 5c, 5d, 5e, 5f, 5g, 5h, 5i, 5j, 5k, 5l, 5m, 5n, 5o, 5p, 5q, 5r, 5s, 5t, 5u, 5v, 5w, 5x, 5y, 5z
(XII)	9,3	5,6	14,1	4,7	<0,5	<0,5	4,7	4,7	~12	26,8	53,6	40,0	20,5	5,4 - OH, 5a, 5b, 5c, 5d, 5e, 5f, 5g, 5h, 5i, 5j, 5k, 5l, 5m, 5n, 5o, 5p, 5q, 5r, 5s, 5t, 5u, 5v, 5w, 5x, 5y, 5z
(XVII)	7,8	1,7	15,6	5,4	<0,5	<0,5	4,3	4,3	~12	24,7	54,7	40,0	23,8	5,7 - OH, 5a, 5b, 5c, 5d, 5e, 5f, 5g, 5h, 5i, 5j, 5k, 5l, 5m, 5n, 5o, 5p, 5q, 5r, 5s, 5t, 5u, 5v, 5w, 5x, 5y, 5z

ной является $C2'$ -эндо/ $C3'$ -экзо-(2/3Т)-конформация фуранозного кольца подобно тому, как это имеет место в случае пиримидиновых β -нуклеозидов [4]. В этой конформации величина двугранного угла $4'$ -Н/Ф меньше величины угла $2'_a$ -Н/Ф, что согласуется с большей абсолютной величиной $^3J_{4',F}$ в сравнении с $^3J_{2'_a,F}$. При переходе от β -нуклеозида (I) к его α -аномеру (II) резонансные сигналы протонов $2'_a$ -Н и $2'_b$ -Н претерпевают смещение в противоположных направлениях. В случае аномерных пар пуриновых соединений (VI) и (X), (XII) и (XVII) подобного смещения сигналов при $2'$ -атоме углерода не наблюдается. Таким образом, влияния пиримидинового и пуринового гетероциклического основания на протоны при $2'$ -атоме фуранозного кольца существенно различаются. Напротив при переходе от β - к α -аномерам резонансный сигнал $4'$ -Н смещается в слабое поле на 0,34–0,39 м. д. в случае как пиримидиновых, так и пуриновых соединений. Место присоединения углеводного остатка к гетероциклическому основанию было установлено на основании данных УФ-спектроскопии при различных значениях pH (ср. с данными работ [8, 9]). В спектрах КД аномерных адениновых нуклеозидов (VI) и (X) обнаруживаются эффекты Коттона низкой интенсивности, что затрудняет определение аномеров. Напротив, в случае гуаниновых нуклеозидов (XII) и (XVII) спектры КД хорошо коррелируют с таковыми $2'$ -дезоксигуанозина и его α -аномера соответственно [10].

Синтез dAMP(3'F) (VII) был осуществлен действием хлорокиси фосфора в триметилфосфате на нуклеозид (VI) по методу, описанному в работе [11]. Этот метод оказался непригодным для синтеза dGMP(3'F) (XIV) ввиду лабильности гликозидной связи нуклеозида (XII) в условиях реакции, приводящей к полной деструкции исходного соединения. Успешным оказалось использование следующего ряда превращений: после деацетилирования соединения (XI) действием метилата натрия в смеси метанол — диоксан (1 : 1) был получен нуклеозид (XII) с выходом 74%. Обработка последнего пиродифосфорилхлоридом в этилацетате [12], затем деацилирование концентрированным водным аммиаком и хроматография продуктов реакции на DEAE-сепадексе А-25 ($HC_3O_3^-$ -форма) давали dGMP(3'F) (XIV) с выходом 35%. Превращение монофосфатов (VII) и (XIV) в соответствующие 5'-трифосфаты (VIII) и (XV) и доказательство их структуры было выполнено аналогично описанному в работе [2].

Все синтезированные dNTP(3'F) были изучены в бесклеточной системе синтеза ДНК в качестве субстратов для ревертазы AMV и фрагмента Кленова.

Электрофорграмма ДНК, синтезированной с помощью фрагмента Кленова на ДНК фага M13mp10 в присутствии каждого из четырех dNTP(3'F), свидетельствует (рис. 1), что dNTP(3'F) — терминирующие субстраты для фрагмента Кленова. Последовательность нуклеотидов в продуктах синтеза легко читается по электрофорграмме и соответствует матрице (затравка подчеркнута):

5'-	10	20	30	40	50
CCCAGT	CACG	ACGTTG	TAA AACG	ACGGCC	AGTGCCAAG
CTTGGG	CTGCA	CTAGAG	GATCCC	CGGCGAG	CTCGAATTC
GTGCA	CTAGAG	GATCCC	CGGCGAG	CTCGA	AATTCATG
CTGCA	CTAGAG	GATCCC	CGGCGAG	CTCGA	AATTCATG
AGCTG	110	120	130	140	
TTTCTG	TGTA	AATTG	TATCCG	CTCACA	AATTC
TTTCTG	TGTA	AATTG	TATCCG	CTCACA	AATTC

Порядковые номера нуклеотидов приведены, начиная с 5'-концевого нуклеотида затравки. Идентичная картина получена и для ревертазы AMV (не приводится).

Картина терминации, приведенная на рис. 1, а также данные работы [3] однозначно показывают, что dNTP(3'F) являются терминирующими элонгацию необратимыми ингибиторами синтеза ДНК с помощью фрагмента Кленова, ревертазы AMV и концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы Боллума (КФ 2.7.7.31). dNTP(3'F) включаются в цепь ДНК подобно обычному субстрату и предотвращают дальнейшую элонгацию цепи

Рис. 1. Анализ первичной структуры ДНК (от 56-го до 140-го нуклеотида), синтезированной с помощью фрагмента Кленова на ДНК фага M13mp10 с заправкой $\text{p}r\text{CCSAGTCAACGACGC}$ и терминирующим трифосфатом $\text{dCTP}(3'\text{F})$ (1), $\text{dTTP}(3'\text{F})$ (2), $\text{dATP}(3'\text{F})$ (3), $\text{dGTP}(3'\text{F})$ (4). Электрофорез в 8% ПААГ в 100 мМ триборатном буфере, pH 8,3, содержащем 7 М мочевины

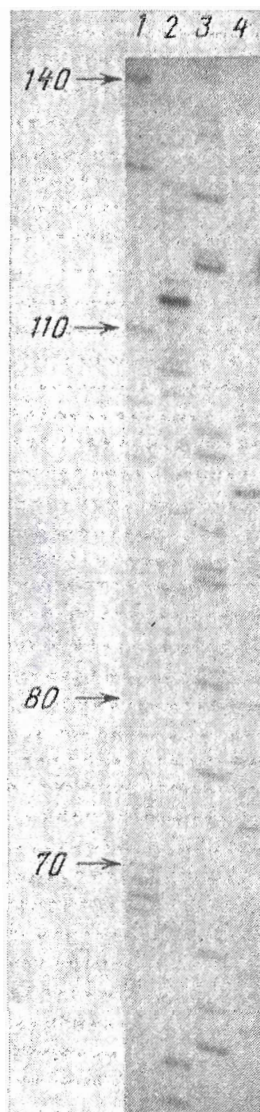


Рис. 1

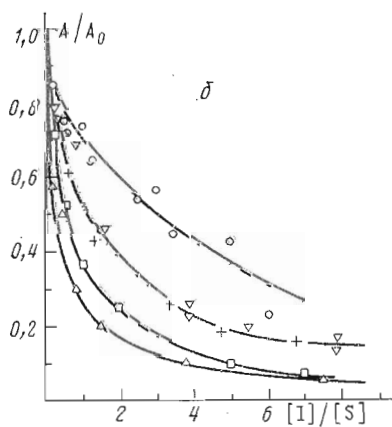
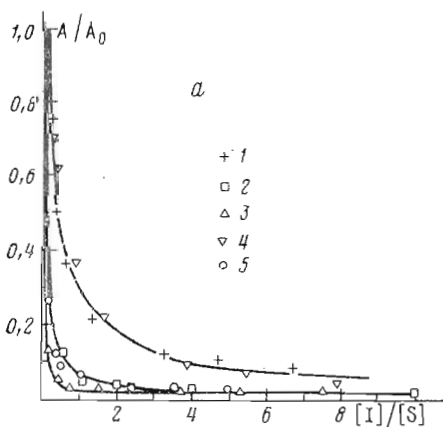


Рис. 2

ДНК подобно другим аналогам dNTP, имеющим заместители в 3'-положении сахара нуклеозидтрифосфатов [13, 14].

Качественно факт терминации цепи ДНК данным типом аналога и его включения в 3'-конец продукта полимеризации легко устанавливается экспериментом, показанным на рис. 1.

Охарактеризовать эффективность терминирующего нуклеотида количественно по таким данным трудно, а кривые ингибирования, построенные по стандартной схеме с использованием зависимостей типа Михаэлиса — Ментен или просто измерением ID_{50} , не информативны, так как каждый ингибитор помимо способности включаться в цепь полимера обычно обладает способностью конкурентно ингибировать реакцию с природным субстратом. Кроме того, некоторые аналоги dNTP, не являющиеся ингибиторами, терминирующими цепь ДНК, могут обладать способностью достаточно сильно, но обратимо ингибировать полимеризацию. Более того, при матричном синтезе лимитирующая стадия реакции не является фиксированной, а зависит от состава субстратной смеси по причине, ранее уже подробно обсужденным для реакции синтеза РНК [15], поэтому определение эффективности терминирующего ингибитора по стандартным кривым ингибирования может привести к ошибочным выводам. Кроме того, эксперименты типа приведенного на рис. 1 не всегда возможно провести, так как для них требуется гомогенная матрица-затравка и высокоочищенная ферментативная система, свободная не только от примесей других ферментов, но и от эндогенных матриц. Если же исследовать, например, гомогенаты вирусов или клеточные гомогенаты, содержащие активный, но неочищенный фермент, то в этих случаях можно при отсутствии адекватного метода анализа прийти к ошибочному выводу [16].

Метод, использованный в настоящем сообщении, хотя и не отработан для использования в неочищенных системах, пригоден для получения количественных характеристик терминирующих аналогов dNTP на фоне специфического и неспецифического обратимого ингибирования и не чувствителен к последнему. (Теоретически он пригоден и для анализа терминирующих свойств аналогов dNTP с неочищенными ферментами.) Метод основан на проведении реакции синтеза ДНК на матрице ограниченного размера, но существенно большего, чем средняя степень удлинения цепи продукта от начала реакции до включения терминирующего (необратимо инактивирующего затравку) аналога нуклеозидтрифосфата. Реакция проводится так долго, чтобы как в присутствии, так и в отсутствие ингибитора было достигнуто плато по времени, т. е. до полного исчерпания затравки либо в результате завершения матрицы, либо в результате необратимой инактивации элонгированной затравки.

Условия реакции подбираются таким образом, чтобы был избыток фермента, достаточный для того, чтобы скорость синтеза не зависела от концентрации последнего. Кроме того, недостаток матрицы-затравки должен обеспечивать пропорциональность скорости реакции и концентрации матрицы-затравки.

Эти условия легко проверяются экспериментально, и им легко удовлетворить как в системах с однонитевой ДНК фага М13 (матрица) с синтетической затравкой, так и с линейризованной плазмидной ДНК рUC12, активированной обработкой экзонуклеазой III. Последняя матрица-затравка и была использована в данной работе. Ее существенное достоинство заключается в том, что матрица имеет определенный конец, протяженный однонитевой участок, и синтез ДНК полностью прекращается при завершении достройки двунитевой структуры. Если нет необратимой инактивации затравки в процессе реакции, то ДНК достраивается полностью независимо от присутствия в среде обратимого ингибитора (последний влияет только на время достройки).

Если при достраивании затравки достигнута степень удлинения, равная x нуклеотидов, то вероятность терминации (W) на звене $x+1$ при условии, что субстрат (S) и терминирующий аналог (I) одноименны и элементарны ($x+1$)-му нуклеотиду матрицы, может быть выражена уравнением

$$W = \left(1 + \frac{k_s}{k_i} \cdot \frac{K_i}{K_s} \cdot \frac{[S]}{[I]} \right)^{-1},$$

где k_s и k_i — кинетические константы включения субстрата и терминирующего субстрата соответственно, $[S]$ и $[I]$ — их концентрации, а K_s и K_i — равновесные константы диссоциации субстрат-ферментных комплексов при условии, что субстрат комплементарен матрице.

Для молекулы ДНК с длиной x существует всего два пути покинуть это состояние: либо присоединить следующий природный нуклеотид, либо терминироваться. Все остальные варианты превращений (например, обратимое присоединение субстрата или аналога, приводящее к непродуктивному комплексу) приводят только к задержке пребывания затравки на нуклеотиде x .

При этом предполагается, что равновесие при связывании субстрата с ферментом устанавливается быстро и что лимитирующей стадией является реакция присоединения. Это не необходимое предположение и при данном описании несущественное.

Если пренебречь реакциями включения некомплементарного матрице субстрата, пирофосфоролита и гидролиза, то

$$\frac{Q_{x+1}}{Q_x} = (1 - Wg(x)),$$

где Q_x — количество молекул затравки, достигавших в нетерминированном состоянии степени удлинения, равной x нуклеотидов, и где $g(x) = 1$, если I одноименен комплементарному матрице нуклеотиду и $g(x) = 0$ в противоположном случае.

Тогда

$$\frac{Q_{x+1}}{Q_0} = \prod_{n=1}^x (1 - Wg(n)),$$

где Q_0 — начальное число молекул затравки, пригодных для удлинения.

Если полагать, что последовательность нуклеотидов матрицы случайна, а это возможно, если точка начала синтеза ДНК негомогенна и в ДНК нет протяженных блоков одноименных нуклеотидов, то

$$\frac{Q_{x+1}}{Q_0} = (1 - W)^{[ax]},$$

где a — мольная доля нуклеотида, одноименного ингибитору в продукте, а квадратные скобки обозначают округление до ближайшего целого числа.

При матрице-затравке, полученной экзонуклеазной обработкой и имеющей широкое и случайное распределение длины, такое приближение правомочно. При этом количество нуклеотидов, включенных в полимерную фракцию в присутствии терминатора (A), относится к той же величине в его отсутствие (A_0) следующим образом:

$$\frac{A}{A_0} = \sum_{x=1}^l \prod_{n=1}^x (1 - Wg(n)) \approx \frac{R+1}{al} \left[1 - \left(\frac{R}{1+R} \right)^{al} \right],$$

где

$$R = \frac{k_s K_i [S]}{k_i K_s [I]} = \frac{1 - W}{W},$$

l — расстояние в нуклеотидах от точки инициации синтеза ДНК до конца матрицы.

Введя среднюю длину пробега ДНК-полимеразы до терминирования цепи:

$$m = \frac{R+1}{a},$$

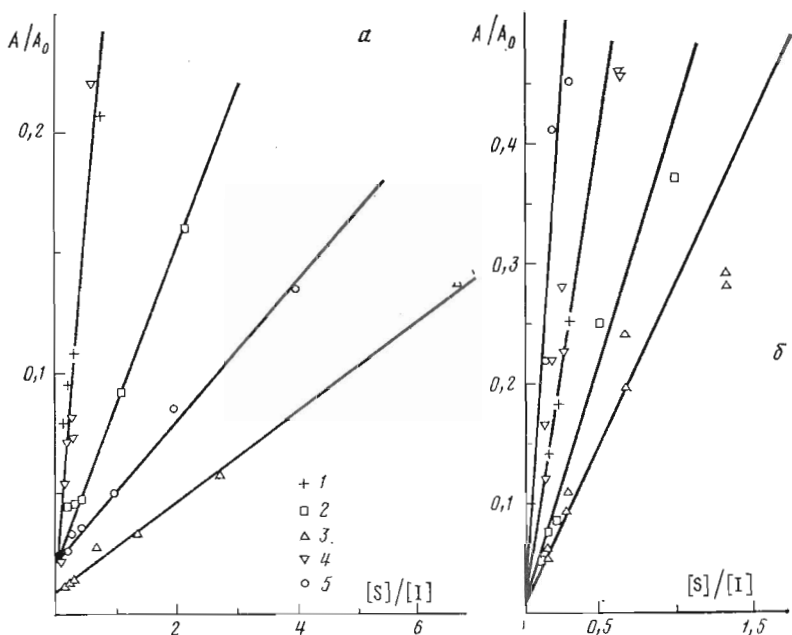


Рис. 3. Линейзация кривых зависимости синтеза ДНК ревертазой AMV (а) и фрагментом Кленова (б) от концентрации dNTP (3'F). Обозначения кривых на рис. 2

получим простую, наглядную формулу $A/A_0 \sim m/l$ для отношения средних длин пробега ДНК-полимеразы в присутствии и в отсутствие терминатора. Более строгое описание дает то же выражение, но с более строгим определением метода усреднения.

При $l \gg m$ и $m \gg 1/a$ получим, что величина $A/A_0 al \sim [S]/[I]$, т. е. описывается линейной зависимостью. Ее наклон есть $k_s K_1 / k_i K_s$, т. е. отношение эффективных скоростей включения субстрата и терминатора. Более строгий анализ показывает, что область линейности функции A/A_0 с точностью до 5% лежит в пределах от 0,02 до 0,35 при длине матрицы $l=200$ нуклеотидов и $a=0,25$.

На рис. 2 и 3 показана зависимость A/A_0 от отношения концентраций терминирующего ингибитора и субстрата ($[I]/[S]$) для ревертазы (рис. 2) и фрагмента Кленова (рис. 3) при постоянной концентрации природных субстратов, равной 10 мкМ, и в условиях независимости от времени реакции и концентрации фермента.

Величину ID_{50} , принятую для оценки эффективности ингибитора [16], можно легко получить из приведенных данных. Однако здесь эта величина соответствует концентрации, обеспечивающей 50%-ное ингибирование за счет необратимой инактивации затравки вместо обычного 50%-ного ингибирования при малом времени реакции, т. е. за счет обоих эффектов (обратимого и необратимого).

Количественно эффективность ингибирования удобнее оценивать из линейной анаморфозы полученных кривых предложенным выше способом, т. е. построением зависимости A/A_0 от $[S]/[I]$. При этом относительная эффективность включения dNTP (3'F) в цепь синтезируемой ДНК по сравнению с включением природных субстратов может быть получена умножением тангенса угла наклона полученных прямых на al , где в используемой системе величина a для А, G, С, Т равна 0,24; 0,28; 0,25 и 0,23 соответственно (что следует из результатов компьютерного анализа нуклеотидного состава однонитчатого участка ДНК рUC12), а l равна либо 200, либо 600 нуклеотидам.

Результаты такого анализа для ревертазы AMV и фрагмента Кленова свидетельствуют, что dNTP (3'F) по эффективности ингибирования образуют один и тот же ряд по основанию нуклеозида как для фрагмента

Кленова, так и для ревертазы AMV: $G > T > A = C$. Вычисление предложенным выше способом относительных эффективностей включения dNTP (3'F) (с 10% точностью) показывает, что в случае ревертазы dATP (3'F), dCTP (3'F) включаются в синтезируемую цепь ДНК в 14 раз хуже природных субстратов, dTTP (3'F) — в 3 раза хуже, а dGTP (3'F) — с одинаковой с dGTP эффективностью. При этом ddATP* включается в 1,4 раза хуже dATP и в 10 раз лучше, чем dATP (3'F). Следует заметить, что dGTP (3'F) в реакции с ревертазой в 14 раз, а в случае фрагмента Кленова — в 2,5 раза более эффективный ингибитор, чем dATP (3'F).

В реакции с фрагментом Кленова наименее эффективным ингибитором оказался ddATP, который включался в синтезируемую цепь ДНК с эффективностью, в 240 раз меньшей, чем природный субстрат, затем следуют dATP (3'F), dCTP (3'F) с эффективностью, в 110 и 120 раз меньшей, dTTP (3'F) — в 55 раз и dGTP (3'F) — в 44 раза включающиеся хуже соответствующих природных субстратов.

Исследованные в настоящей работе dNTP (3'F) не являются необратимыми ингибиторами для ДНК-полимеразы α тимуса теленка (КФ 2.7.7.7) (результаты не приводятся), и, значит, реакция, катализируемая ДНК-полимеразой α , не чувствительна к dNTP (3'F) в данном тесте.

Приведенные данные подтверждают ранее сделанный вывод о том, что для реакции, катализируемой фрагментом Кленова и ревертазой AMV dNTP (3'F), являются терминирующими цепь необратимыми ингибиторами полимеризации. Полученные относительные количественные характеристики эффективности использования различных по основанию dNTP (3'F) образуют один и тот же ряд. В какой степени этот ряд обусловлен структурой матрицы, неясно, и требуются дополнительные данные для ответа на этот вопрос.

Экспериментальная часть

УФ-спектры записаны на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss, ГДР), ИК-спектры — на спектрофотометре UR-20 (Carl Zeiss, ГДР), ¹H-ЯМР-спектры — на спектрометре WM-360 (Bruker, ФРГ), масс-спектры — на спектрометре MS 902S (AEI, Manchester, Англия) с прямым вводом образца в источник при температуре 150–200°С и ионизирующем напряжении 70 эВ. КД-спектры записаны на спектрополяриметре J-20 (Jasco, Япония). Хроматография в тонком слое (ТСХ) проводилась на пластинках силикагеля F1500 LS 254 (Schleicher und Schüll, ФРГ) (А), Kieselgel 254 (Merck, ФРГ) (В) и Silufol UV-254 (Kavalier, ЧССР) (С) в следующих системах растворителей: 1) хлороформ — метанол, 24 : 1; 2) хлороформ — этанол, 18 : 1 (двукратное элюирование); 3) этилацетат (двукратное элюирование); 4) хлороформ — метанол, 9 : 1 (двукратное элюирование); 5) изопропанол — вода — концентрированный водный аммиак, 7 : 2 : 1; 6) *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 5 : 2 : 3. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L40/100 (ЧССР). Все операции, если специально не оговорено в тексте, проводились при комнатной температуре.

5'-О-Ацетил-2',3'-дидезокси-3'-фтортимидин (I) был получен из 2',3'-дидезокси-3'-фтортимидина аналогично описанному в работе [4] для синтеза 5'-О-ацетил-2',3'-дидезокси-3'-фторуридина; выход 92%, т. пл. 144–146°С (из этилацетата).

6-N-Бензоиладенин и 2-N-пальмитоилгуанин были получены как описано в работах [17] и [18] соответственно.

2',3'-Дидезокси-3'-фторадеозин (VI) и его 5'-трифосфат (VIII). Смесь 1,65 г (5,76 ммоль) нуклеозида (I), 1 мл (1,225 г, 5,5 ммоль) TMS-Tf и 4,87 г (12,7 ммоль) бистриметилсилильного производного 6-N-бензоиладенина (III), полученного силилированием 3,04 г (12,7 ммоль) 6-N-бензоиладенина триметилхлорсиланом (3,5 мл, 3,0 г, 27,7 ммоль) в 120 мл бензола в присутствии 3,83 мл (2,79 г, 27,7 ммоль) триэтиламина, в 60 мл

* 2',3'-дидезокси-АТР.

ацетонитрила кипятили 5 ч без доступа влаги. Реакционную смесь упарили с толуолом (50 мл) и хроматографировали на силикагеле (200 см³), элюируя продукты реакции гексаном (500 мл), затем линейным градиентом концентрации этилацетата в гексане (от 0 до 100 об.%; 2 л). Фракции, содержащие индивидуальные соединения, объединили и упарили досуха. В порядке выхода с колонки получили: исходный фторид (I), 0,15 г (9,1%), т. пл. 144–146°С (из этилацетата); R_f 0,66 (А-1)*; УФ (метанол, λ_{\max} , нм ($\lg \epsilon$)): 267(3,97); КД (метанол, λ , нм ($[\theta] \cdot 10^{-3}$)): 274(+7,3), 257(0), 214(-9,8).

I - (5'-О-Ацетил-2,3-дидезокси-3'-фтор- α -D-рибофуранозил)тимин (II), 0,3 г (18,2%), бесцветное масло, R_f 0,61 (А-1). УФ (метанол, λ_{\max} , нм ($\lg \epsilon$)): 267 (4,00); КД (метанол, λ , нм ($[\theta] \cdot 10^{-3}$)): 269 (-12,5), 240(0).

5'-О-Ацетил-6-N-бензоил-2',3'-дидезокси-3'-фторадеозин (V), 0,6 г (26%), бесцветное масло, R_f 0,83 (А-1). УФ (метанол, λ_{\max} , нм ($\lg \epsilon$)): 281(4,24), 235(4,0).

9-(5'-О-Ацетил-2',3'-дидезокси-3'-фтор- α -D-рибофуранозил)-6-N-бензоиладенин (IX), 0,6 г (26%), бесцветное масло, R_f 0,77 (А-1). УФ (метанол, λ_{\max} , нм ($\lg \epsilon$)): 281(4,23), 259 пл (3,98), 235(3,99).

2',3'-Дидезокси-3'-фторадеозин (VI). Раствор 0,6 г (1,5 ммоль) ацетата (V) в 70 мл метанола, насыщенного газообразным аммиаком при 0°С, выдерживали 18 ч и упарили досуха. Остаток растирали с эфиром (3×30 мл), эфир декантировали и остаток кристаллизовали из этанола. Получено 0,3 г (79%) соединения (VI), т. пл. 194–195°С, R_f 0,38 (А-1). УФ (вода, λ_{\max} , нм ($\lg \epsilon$)): 261(4,11). Масс-спектр (m/z): 253 (M^+), 119 ($C_5H_8O_2F^+$). Найдено, %: С 47,40; Н 4,78; N 27,66. $C_{10}H_{12}N_2O_2F$. Вычислено, %: С 47,43; Н 4,77; N 27,65.

9-(2',3'-Дидезокси-3'-фтор- α -D-рибофуранозил)аденин (X) получен из ацетата (IX) аналогично описанному выше для фторида (VI), выход 79%, т. пл. 220–221°С (из этанола), R_f 0,16 (А-1). УФ (вода, λ_{\max} , нм ($\lg \epsilon$)): 261(4,10). Масс-спектр (m/z): 253 (M^+), 119 ($C_5H_8O_2F^+$). Найдено, %: С 47,46; Н 4,75; N 27,62. $C_{10}H_{12}N_2O_2F$. Вычислено, %: С 47,43; Н 4,77; N 27,65.

2',3'-Дидезокси-3'-фторадеозин-5'-монофосфат (VII). К смеси 0,04 мл (70 мг, 0,45 ммоль) хлорокиси фосфора и 0,35 мл (420 мг, 3,0 ммоль) триметилфосфата при 0°С добавили 60 мг (0,24 ммоль) нуклеозида (VI), реакционную смесь перемешивали 1 ч при 0°С, затем добавили 10 мл эфира, раствор декантировали и к маслообразному остатку добавили 1 мл воды (0°С), полученный раствор нейтрализовали 1 М ТЕАВ до pH 7 и нанесли на колонку с ДЕАЕ-сефадексом А-25 (AcO⁻-форма, 30 мл). Элюцию проводили уксусной кислотой в воде (линейный градиент 0,005–1 М, общий объем 300 мл). Получили 40 мг (50%) соединения (VII) в виде свободной кислоты, R_f 0,60 (А-5). УФ (вода, λ_{\max} , нм ($\lg \epsilon$)): 260 (4,14).

2',3'-Дидезокси-3'-фторадеозин-5'-трифосфат (VIII). К раствору 126,5 мг (0,18 ммоль) трибутиламмониевой соли монофосфата (VII), полученной упариванием в вакууме 60 мг (0,18 ммоль) фосфата (VII) с 0,086 мл (66,6 мг, 0,36 ммоль) три-*n*-бутиламина в смеси 5 мл пиридина и 1 мл воды, в 2 мл абс. диметилформамида добавили раствор 162 мг (1,0 ммоль), N,N'-карбонилдимидазола в 2 мл DMF и перемешивали 18 ч. К реакционной смеси добавили 60 мкл метанола и через 30 мин раствор 918 мг (1,0 ммоль) трибутиламмониевой соли пирофосфорной кислоты в 8 мл DMF. Смесь перемешивали 18 ч, осадок отфильтровали, фильтрат упарили досуха, остаток хроматографировали на ДЕАЕ-сефадексе А-25 (HCO₃⁻-форма, 50 мл), элюируя продукты реакции ТЕАВ (линейный градиент концентрации 0,001–0,7 М, общий объем 1 л). Соответствующие фракции объединяли и упаривали. Получили 80,7 мг (50%) соединения (VIII) в виде натриевой соли [19], R_f 0,10 (А-5). УФ (вода, λ_{\max} , нм ($\lg \epsilon$)): 260(4,14).

* Здесь и далее при описании ТСХ: буква – сорбент, цифра – система.

2',3'-Дидезокси-3'-фторгуанозин (XII) и его 5'-трифосфат (XV). Суспензию 1,6 г (4,1 ммоль) 2-N-пальмитойлгуанина в смеси гексаметилдисулазана (13 мл) и триметилхлорсилана (0,7 мл) кипятили 5 ч, добавляя через 1 и 4 ч по 0,5 мл триметилхлорсилана. Гомогенную реакционную смесь упарили досуха и остаток упарили с толуолом (3×15 мл) для удаления следов гексаметилдисулазана. Сиропообразный остаток триметилсилильного производного 2-N-пальмитойлгуанина (IV) растворили в 15 мл безводного ацетонитрила, к раствору добавили 0,68 г (2,37 ммоль) нуклеозида (I) и 0,55 мл (0,67 г, 3,03 ммоль) TMS-TfI, реакционную смесь кипятили 3 ч без доступа влаги, охладили до 20°С и вылили при перемешивании в смесь насыщенного водного раствора бикарбоната калия и этилацетата (1 : 1, по объему; 150 мл). Органический слой отделили, водный слой промыли этилацетатом (2×50 мл), органические экстракты объединили и выпавший 2-N-пальмитойлгуанин (0,4 г) отфильтровали. Фильтрат упарили досуха, остаток упарили с бензолом (50 мл) и хроматографировали на силикагеле (100 см³), элюируя продукты реакции хлороформом (150 мл), затем линейным градиентом концентрации этанола в хлороформе (от 0 до 4 об.%; 1,1 л). Фракции, содержащие индивидуальные соединения, объединили и упарили досуха. В порядке выхода с колонки получили: исходный нуклеозид (I), 70 мг (10%), R_f 0,64 (B-3); α -нуклеозид (II), 150 мг (22%), R_f 0,54 (B-3); смесь α - и β -аномеров 7 - (5'-O-ацетил-2',3'-дидезокси-3'-фтор-D-рибофуранозил)-2-N-пальмитойлгуанина (XVIII), 300 мг (23%), после кристаллизации из этанола получено 230 мг (17%), т. пл. 144–154°С, R_f 0,44 (B-3); 9-(5'-O-Ацетил-2',3'-дидезокси-3'-фтор- β -D-рибофуранозил)-2-N-пальмитойлгуанин (XI), 320 мг (24,5%), после перекристаллизации из этанола получено 220 мг (17%), т. пл. 157–158°С, R_f 0,40 (B-2). УФ (этанол, λ_{max} , нм (lg ϵ)): 281(4,20), 257(4,32), 203(4,52); 9-(5'-O-ацетил-2',3'-дидезокси-3'-фтор- α -D-рибофуранозил)-2-N-пальмитойлгуанин (XVI), 240 мг (18%), после кристаллизации из этанола получено 170 мг (13%), т. пл. 153–154°С, R_f 0,34 (B-2), УФ (этанол, λ_{max} , нм (lg ϵ)): 283(4,10), 257(4,22), 203(4,43).

Суспензию 200 мг (0,364 ммоль) смеси α - и β -аномеров (XVIII) в 20 мл насыщенного при 0°С раствора аммиака в метаноле перемешивали до полного растворения (2–3 ч) и реакционную смесь выдерживали 24 ч. Образовавшийся кристаллический продукт отфильтровывали, промыли метанолом и высушили. Получили 50 мг соединения (XIX) в виде смеси α - и β -аномеров. Объединенные фильтраты упарили досуха и остаток кристаллизовали из метанола. Получили дополнительно 20 мг соединения (XIX); общий выход 71%, т. пл. 280°С (разл.), R_f 0,53 (B-6). УФ (λ_{max} , нм (lg ϵ)) при pH 1: 250(4,02), 277(3,85); в воде: 286(3,86), 241(3,78), 216(4,30); при pH 11: 283(3,84), 240 пл (3,83). ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆; δ , м.д.; J , Гц): 7,92 (с, 8-H), 7,90 (с, 8-H, β -аномер), 6,53 (дд, 4'-H, $J_{1',2'_a}$ 7,2, $J_{1',2'_b}$ 1,0), 2,79 (м, 2'-H, $J_{2'_a,2'_b}$ 15,6, $J_{2'_a,3'}$ 5,1, $J_{2'_a,F}$ 39,7), 2,57 (м, 2'-H, $J_{2'_b,3'}$ < 0,5, $J_{2'_b,F}$ 22,6), 5,32 (дд, 3'-H, $J_{3',4'}$ < 0,5, $J_{3',F}$ 54,1), 4,61 (дт, 4'-H, $J_{4',5'_a}$ = $J_{4',5'_b}$ 4,2; $J_{4',F}$ 25,25), 3,55 (м, 5'-H, $J_{5'_a,5'_b}$ 12), 3,47 (м, 5'-H), 6,20 (ус, NH₂), 6,16 (ус, NH₂, β -аномер), 5,04 (т, 5'-ОН, $J_{5'_a,OH}$ = $J_{5'_b,OH}$ 5,7), 5,10 (т, 5'-ОН, $J_{5'_b,OH}$ = $J_{5'_a,OH}$ 5,5, β -аномер), 10,92 (ус, NH), 10,82 (ус, NH, β -аномер). Масс-спектр (m/z): 269 (M^+), 119 (C₅H₈O₂F⁺).

Суспензию 200 мг (0,364 ммоль) соединения (XI) в 25 мл насыщенного при 0°С раствора аммиака в метаноле перемешивали 24 ч. Гомогенную реакционную смесь упарили до 5 мл, образовавшийся кристаллический продукт отфильтровывали, промыли метанолом, высушили. Получили 80 мг (82%) нуклеозида (XII), т. пл. 265°С (потемнение), 300°С (разл.), R_f 0,12 (B-4). УФ (λ_{max} , нм (lg ϵ)) при pH 1: 275 пл. (3,88), 252(4,03); в воде: 277 пл. (3,92), 253(4,11), 202(4,09); при pH 11: 258–270(4,04). КД (этанол–вода, 50 : 1; λ , нм ($[\theta] \cdot 10^{-3}$): 250(–4,1), 230(0), 210(+8,2). Масс-спектр (m/z): 269 (M^+), 119 (C₅H₈O₂F⁺).

Аналогично описанному выше, исходя из 200 мг (0,364 ммоль) соединения (XVI), получили 76 мг (78%) нуклеозида (XVII), т. пл. 300°С (разл.), R_f 0,05 (Б-4). УФ (λ_{\max} , нм (lg ϵ)) при рН 1: 280 пл. (3,93), 256(4,10), 205(4,17); в воде: 278 пл. (3,97), 254 (4,14), 204(4,17); при рН 11: 258–270(4,08). КД (этапол – вода, 50 : 1; λ , нм ($[\theta] \cdot 10^{-3}$)): 250(+2,4), 230(0), 208(-1,2). Масс-спектр (m/z): 269 (M^+), 119 ($C_5H_8O_2F^+$).

9 - (2',3' - Дидезокси - 3'-фтор- β -D-рибофуранозил)-2-N-пальмитоилгуанин (XIII). К 40 мл раствора 0,5 г (0,91 ммоль) соединения (XI) в смеси абс. диоксиана и абс. метанола (1 : 1) добавили раствор 0,3 г натрия в абс. метаноле (5 мл), реакционную смесь перемешивали 15 мин. Согласно данным ТСХ (В-2), за указанный промежуток времени исходное соединение (XI), R_f 0,40 (В-2) количественно превращается в дезацетилованный нуклеозид (XIII), R_f 0,21 (В-2). Реакционную смесь нейтрализовали дауэксом 50W \times 12 (H^+ -форма, в метаноле), смолу отфильтровали, промыли метанолом и фильтрат упарили досуха. Остаток кристаллизовали из этанола. Получили 0,34 г (74%) соединения (XIII), т. пл. 154–155°С. УФ (этанол, λ_{\max} , нм (lg ϵ)): 282(4,14), 257 (4,25), 204(4,41). В ИК-спектре отсутствует полоса $\nu_{C=O}$ при 1750 cm^{-1} , которая имеется в спектре исходного соединения (XI).

К суспензии 0,3 г (0,59 ммоль) соединения (XIII) в 8 мл безводного этилацетата, охлажденной до 0°С, добавили при перемешивании 0,42 мл (0,75 г, 2,95 ммоль) свежеперегнанного пиррофосфорилхлорида, гомогенную реакционную смесь перемешивали 3 ч при 0°С, нейтрализовали водным насыщенным раствором бикарбоната натрия и упарили досуха. К остатку добавили 15 мл концентрированного водного раствора аммиака, реакционную смесь нагревали 4 ч при 65°С и упарили досуха. Остаток обработали хлороформом (3 \times 10 мл), нерастворившуюся часть хроматографировали на DEAE-сефадексе А-25 (HCO_3^- -форма, 80 cm^3), элюируя продукты реакции линейным градиентом ТЕАВ-буфера (0,001–0,8 М, общий объем 1 л). Фракции, содержащие монофосфат (XIV), объединили и упарили досуха. Получили 115 мг (35%) аморфного монофосфата в виде бистриэтиламмониевой соли, R_f 0,21 (В-6). УФ (вода, λ_{\max} , нм): 253, 275 пл.

К раствору 52,4 мг (0,095 ммоль) монофосфата (XIV) в 2 мл абс. пиридина добавили 0,083 мл (0,067 г, 0,19 ммоль) три-*n*-октиламина, упарили досуха, остаток упарили с абс. пиридином (3 \times 2 мл) и абс. DMF (2 \times 2 мл), растворили в 1,5 мл абс. DMF и добавили 77,4 мг (0,477 ммоль) N,N'-карбонилдимидазола. Реакционную смесь перемешивали 3 ч, осуществляя контроль за ходом реакции с помощью ТСХ (С-5): исходное соединение – R_f 0,49, имидазол – R_f 0,72. К реакционной смеси добавили 0,03 мл (0,76 ммоль) абс. метанола и через 30 мин раствор 518 мг (0,515 ммоль) трибутиламмониевой соли пиррофосфорной кислоты в 5 мл абс. DMF. Реакционную смесь перемешивали 12 ч, осадок отфильтровали, фильтрат упарили досуха, остаток хроматографировали на DEAE-сефадексе А-25 (HCO_3^- -форма, 70 мл), элюируя продукты реакции ТЕАВ-буфером (линейный градиент концентрации 0,001–0,8 М, общий объем 1 л). Соответствующие фракции объединяли и упаривали. Получили 37,9 мг (44%) соединения (XV) в виде натриевой соли [19], R_f 0,16 (В-6). УФ (вода, λ_{\max} , нм): 253, 276 пл.

Субстратные свойства dNTP(3'F) в реакции с фрагментом Кленова и ревертазой AMV определяли в бесклеточной системе, содержащей матрицу и затравку, природные dNTP, буфер и соли.

а. Природные субстраты dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Sigma, США), [α - ^{32}P]dNTP с уд. акт. 1000–3000 Ки/ммоль (Изотоп, СССР) использовали без дополнительной очистки. Чистоту dNTP и dNTP(3'F) проверяли хроматографией в тонком слое, как описано выше, и апалитической ВЭЖХ на приборе Du Pont 8800 (США) на колонке Altex Ultrasil-NH $_2$ с размером частиц сорбента 10 мкм. Соединения элюировали линейным градиентом концентрации 0,05–1 М фосфата калия (рН 7,0) в течение 50 мин при скорости потока 2 мл/мин.

б. Матрица и затравка были получены следующим образом: ДНК рUC12 гидролизovali рестриктазой *EcoRI*, затем добавляли экзонуклеазу III до концентрации 20 ед. акт/мл и инкубировали 5–20 мин при 42° С. Образующийся однонитевый участок ДНК имел длину от 200 до 600 нуклеотидов. Длину однонитцевого участка определяли рестрикционным картированием ДНК после достраивания ее второй нити в присутствии α -³²P-меченого dNTP. Полученную ДНК депротенизировали фенолом, хроматографировали на агарозе A15m и использовали как матрицу-затравку для определения активности ревертазы AMV и фрагмента Кленова. Использовали два препарата ДНК: с длиной однонитцевого участка 200±50 нуклеотидов в системе с ревертазой и 600±100 нуклеотидов — с фрагментом Кленова.

в. Фрагмент Кленова выделяли из *E. coli* CJ155, любезно предоставленного нам К. М. Джойс [20], используя двухфазную систему декстран — полиэтиленгликоль [21], с последующей хроматографией полученного продукта на ДНК-агарозе, гидроксиапатите и сефадексе G-100.

Ревертаза AMV была любезно предоставлена А. Я. Шевелевым (ВКНЦ). Экзонуклеаза III *E. coli* получена от фирмы Amersham (Англия).

г. Реакционная смесь для определения субстратных свойств dNTP (3'F) содержала в 10 мкл 50 мМ трис-HCl (pH 8,4), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 20 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0,1 мМ EDTA, 0,25 мкг (14 нМ) ДНК рUC12, обработанной рестриктазой *EcoRI* и экзонуклеазой III, dNTP (10 мкМ каждый), 1 мкКи [α -³²P]dNTP (0,03 мкМ), равномолярный по основанию с используемым в смеси dNTP (3'F), один из dNTP (3'F) в указанной концентрации, 0,2 ед. акт. фрагмента Кленова или 3 ед. акт. ревертазы. (За единицу активности принимали количество фермента, способное включить 1 нмоль dNMP в цепь ДНК за 30 мин при 37° С.)

Во всех исследованных системах реакцию начинали добавлением фермента и заканчивали через 40 мин добавлением 20 мМ EDTA. Реакцию с фрагментом Кленова проводили при 20° С, с ревертазой — при 42° С. Количество синтезированного продукта определяли, нанося реакцию смесь на бумагу GF/C, которую отмывали 5% трихлоруксусной кислотой от не включившегося в цепь ДНК [α -³²P]dNTP. Каждую инкубационную пробу дублировали в трех независимых опытах.

д. Последовательность нуклеотидов ДНК определяли по методу Сэнгера с dNTP (3'F) в качестве терминаторов, матрицей служила ДНК фага M13mp10, а затравкой — олигонуклеотид (5') dCCCAGTCACGACGT, любезно предоставленный нам А. В. Ажаевым (ВНИИ биотехнологии). Олигонуклеотид фосфорилировали по 5'-концу полинуклеотидкиназой фага T4 и [γ -³²P]ATP по методу [22]. Матрицу с затравкой сплавляли при 60° С в течение 10 мин с последующим медленным охлаждением. Затем матрицу-затравку отделяли на колонке с сефадексом G-100 в 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, содержащем 50 мМ NaCl.

Реакцию синтеза ДНК проводили в среде, содержащей в 20 мкл 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 5 мМ MgCl₂, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 мкг/мл BSA, 0,1 мкг ДНК, 0,2 ед. акт. фрагмента Кленова. Концентрация природного dNTP, одномолярного с F-аналогом, была 2 мкМ, остальных трех по 10 мкМ, концентрация аналога составляла 30 мкМ. Реакцию начинали добавлением фермента и проводили 15 мин при 37° С, затем добавляли все четыре dNTP в концентрации по 250 мкМ и инкубировали еще 10 мин. Реакцию останавливали добавлением EDTA до 20 мМ.

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность фонду им. А. фон Гумбольдта (г. Бонн — Бад-Годесберг, ФРГ) за частичную финансовую поддержку настоящего исследования. Авторы благодарны д-ру Г. Явоволлику (Центральный институт молекулярной биологии АН ГДР, г. Берлин-Бух) за помощь в проведении работы по синтезу нуклеозидов. Авторы благодарны П. В. Кузмичкину и Н. Б. Хрипач за запись ¹H-ЯМР-спектров и Г. С. Янковской за запись УФ- и КД-спектров (Институт биоорганической химии АН БССР).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kvasyuk E. I., Zaitseva G. V., Kuzmichkin P. V., Mikhailopulo I. A., Chidgeavadze Z. G., Scamrov A. V., Beabealashvilli R. Sh., Kowollik G., Langen P. // Abstracts. International Symposium. Present state and perspectives in application of inhibitors of nucleic acids and protein synthesis Varna, Bulgaria. 1985. P. 8-9.
2. Chidgeavadze Z. G., Scamrov A. V., Beabealashvilli R. Sh., Kvasyuk E. I., Zaitseva G. V., Mikhailopulo I. A., Kowollik G., Langen P. // FEBS Lett. 1985. V. 183. № 2. P. 275-278.
3. Sanger F., Neiden S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463-5467.
4. Зайцева Г. В., Квасюк Е. И., Пунейко Н. Е., Кулак Т. И., Пашинник В. Е., Товстенко В. И., Марковский Л. М., Михайлопуло И. А. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1275-1281.
5. Imazawa M., Eckstein F. // J. Org. Chem. 1978. V. 43. № 15. P. 3044-3047.
6. Leeuw de F. A. A. M., Altona C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1982. № 3. P. 375-384.
7. Davies D. B. // Progr. Nuclear Magn. Res. Spectr. 1978. V. 12. Part 3. P. 159-168.
8. Азрем А. А., Михайлопуло И. А., Адарич Е. К., Кулинкович Л. Н., Посщастьева Е. В., Тимошук В. А. // Докл. АН СССР. 1974. Т. 219. № 1. С. 99-101.
9. Роорейко Н. Е., Квасюк Е. И., Михайлопуло И. А., Лидакс М. J. // Synthesis. 1985. № 6/7. P. 605-609.
10. Miles D. W., Townsend L. B., Robins M. J., Robins R. K., Inskceep W. H., Eyring H. // J. Amer. Chem. Soc. 1971. V. 93. № 7. P. 1600-1608.
11. Mikhailopulo I. A., Cramer F. // FEBS Lett. 1982. V. 144. № 1. P. 109-111.
12. Eppstein D. A., Marsh Y. V., Schryver B. B., Larsen M. A., Barnett J. W., Verheyden J. P. H., Prisbe E. J. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 22. P. 13390-13397.
13. Chidgeavadze Z. G., Beabealashvilli R. Sh., Krayevskiy A. A., Kukhanova M. K. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 868. № 16. P. 145-152.
14. Панчизин А. В., Пурьгин П. И., Ажаев А. В., Краевский А. А., Кутателадзе Т. В., Чиджавадзе З. Г., Библашвили Р. Ш. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1367-1379.
15. Айвазашвили В. А., Библашвили Р. Ш., Флорентьев В. Л. // Молекуляр. биология. 1974. Т. 11. № 4. С. 854-864.
16. Matthes E., Lehmann Ch., Scholz D., von Janta-Lipinski M., Gaertner K., Rosenthal H. A., Langen P. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 148. № 1. P. 78-85.
17. Ness R. K. // Synthetic Procedure in Nucleic Acid Chemistry. V. 1./Eds Zorbach W. W., Tirson R. S. N. Y., London, Sydney, Toronto: John Willey & Sons, 1968. P. 184-187.
18. Furukawa Y., Honjo M. // Chem. Pharm. Bull. 1968. V. 16. № 6. P. 1076-1080.
19. Moffatt J. G. // Can. J. Chem. 1964. V. 42. № 3. P. 599-604.
20. Joyce C. M., Grindley N. D. E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 7. P. 1830-1834.
21. Библашвили Р. Ш., Савочкина Л. П. // Молекуляр. биология. 1971. Т. 5. № 2. С. 252-258.
22. Richardson P. I. // Biochemistry. 1977. V. 16. № 23. P. 5120-5126.

Поступила в редакцию
20.V.1988
После доработки
22.XI.1988

**SYNTHESIS OF 3'-FLUORO-2',3'-DIDEOXY-ADENOSINE
AND -GUANOSINE, THEIR 5'-TRIPHOSPHATES, AND STUDY
OF SUBSTRATE PROPERTIES OF FLUORODEOXY ANALOGUES
OF NATURAL 2'-DEOXYNUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATES FOR DNA
POLYMERASES**

KVASYUK E. I., ZAITSEVA G. V., SAVOCHKINA L. P.*, CHIDGEAVADZE Z. G.*,
BEABEALASHVILLI R. Sh.*, LANGEN P.**, MIKHAILOPULO I. A.

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk;

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

***Central Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the GDR, Berlin-Buch*

Potential antiviral and antitumour nucleosides, 3'-fluoro-2', 3'-dideoxy-adenosine and -guanosine, have been synthesized by the chemical transglycosylation reaction using 5'-O-acetyl-3'-fluoro-2', 3'-dideoxy-thymidine and -uridine as donors of the carbohydrate fragment and persilylated 6-N-benzoyladenine and 2-N-palmitoylguanine as acceptors, respectively. 5'-Triphosphates of 3'-fluoro-2', 3'-dideoxy-thymidine, -cytidine

ne, -adenosine, and -guanosine (dNTP(3'F)) were synthesized and tested as terminators in cell-free system of DNA synthesis catalyzed by RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase, RT) from the avian myeloblastosis virus (AMV) and *E. coli* DNA polymerase I (Klenow fragment). A method of estimating relative effectiveness of dNTP(3'F) incorporation into DNA growing chain in comparison with the natural substrates was developed. It is shown that, in case of AMV-RT, dATP(3'F), dCTP(3'F) incorporate 14 times less efficiently than dATP and dCTP respectively, and dTTP(3'F) 3 times less effectively than the corresponding natural substrates, whereas dGTP (3'F) is as efficient as dGTP. With *E. coli* DNA polymerase I (Klenow fragment) dATP (3'F) and dCTP(3'F) are ca. 100 times less efficient, and dTTP(3'F) and dGTP(3'F) are ca. 50 times less efficient than the respective natural substrates.