



УДК 577.113.3.017

## НОВЫЕ НЕНУКЛЕОЗИДНЫЕ СУБСТРАТЫ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИЛТРАНСФЕРАЗЫ: СИНТЕЗ И ОЦЕНКА ЗАВИСИМОСТИ СУБСТРАТНЫХ СВОЙСТВ ОТ СТРУКТУРЫ

© 2005 г. А. Л. Хандажинская<sup>#</sup>, М. К. Куханова, М. В. Ясько*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
119991, Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, 32*

Поступила в редакцию 24.01.2005 г. Принята к печати 03.02.2005 г.

Осуществлен синтез *N*-(9-флуоренилметоксикарбонил)- $\omega$ -аминоалкиловых, *N*-(9-флуоренилметоксикарбонил)-8-амино-3,6-диоксаоктилового и *N*-[(9-флуоренилметоксикарбонил)-6-аминогексаноил]-2-аминоэтилового эфиров трифосфорной кислоты. Показано, что все синтезированные трифосфаты являются субстратами терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы из тимуса теленка, причем их субстратные свойства зависят от длины и структуры линкера, соединяющего 9-флуоренилметоксикарбонильный остаток с трифосфатным фрагментом.

*Ключевые слова:* терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза, субстратные свойства; аналоги нуклеозидтрифосфатов.

### ВВЕДЕНИЕ

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (ТДТ; КФ 2.7.7.31) представляет собой матрично-независимую ДНК-полимеразу, которая играет важную роль в формировании иммунного ответа человека и животных [1]. Природные субстраты этого фермента – 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты. Однако ранее было показано [2], что наличие нуклеозидного фрагмента не является обязательным для проявления трифосфатами субстратных свойств по отношению к ТДТ. В частности, ряд трифосфатов, содержащих вместо нуклеозидной компоненты объемные заместители, узнавались этим ферментом, причем эффективность их узнавания зависела как от природы заместителя, введенного вместо нуклеинового основания [3], так и от природы линкера [4]. Для более подробного изучения влияния длины и структуры линкера на субстратные свойства по отношению к ТДТ нами были синтезированы трифосфаты (Ia)–(Id), (II) и (III), в которых объемный остаток Fmoc, имитирующий нуклеозидную часть, присоединен к трифосфатному фрагменту с помощью различных линкеров.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Соединения (Ia)–(Ic) были получены в результате реакции соответствующего аминспирта с 9-флуоренилметоксикарбонилхлоридом и последующего трифосфорилирования по Людвигу [5] без выделения промежуточных монофосфатов (схема 1).

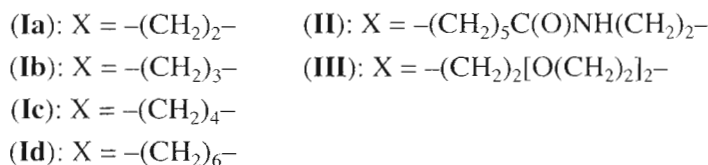
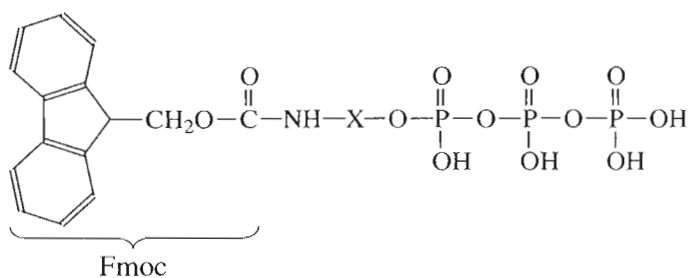
Для получения трифосфата (Id) предварительно был синтезирован 1-монометокситритил-6-аминогексанол (схема 2). Гексан-1,6-диол последовательно обрабатывали монометокситритилхлоридом и метансульфонилхлоридом, затем азидировали и азидогруппу восстанавливали действием 2-меркаптоэтанола. После присоединения остатка Fmoc и удаления (MeO)Tg-защиты проводили трифосфорилирование по Людвигу. Аналогично, из триэтиленгликоля был получен трифосфат (III).

Следует отметить, что в отличие от карбаматной (уретановой) группы в соединениях (I) и (III), амидная связь в соединении (II) лабильна в условиях реакции с хлорокисью фосфора, поэтому мы были вынуждены использовать для него другую схему синтеза (схема 3). 6-Аминогексановую кислоту сначала обрабатывали 9-флуоренилметоксикарбонилхлоридом, затем активировали тионилхлоридом и вводили в реакцию с предварительно силилированным 2-аминоэтилфосфатом. Полученный монофосфат активировали CDI и добавляли трибутилламмониевую соль пиррофосфата (схема 3).

Синтезированные Fmoc-содержащие трифосфаты проявили повышенную лабильность в условиях анионообменной колоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе В связи с этим был разработан

Сокращения: CDI – 1,1'-карбонилдипиридазол; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; ТДТ – терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза.

<sup>#</sup>Автор для переписки (тел.: (095) 135-22-55; факс: (095) 135-14-05; эл. почта: khandazhinskaya@bk.ru).



следующий алгоритм их выделения: реакционную смесь разбавляли водой и пропускали через Dowex-50 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), полученный раствор концентрировали, и целевой продукт выделяли на колонке с обращено-фазовым сорбентом LiChroprep RP-18. Конечные выходы трифосфатов составили 10–20% в расчете на исходный Fmoc-аминоспирт. Все Fmoc-содержащие производные имели характерные УФ-спектры с λ<sub>max</sub> 265 нм и ε 17000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Структура и чистота синтезированных соединений подтверждена также данными ТСХ, <sup>1</sup>H- и <sup>31</sup>P-ЯМР-спектроскопии.

Субстратные свойства синтезированных трифосфатов были изучены в катализируемой TDT реакции элонгации праймера (схема 4). В ходе реакции к 3'-гидроксильной группе 5'-<sup>32</sup>P-меченного олигодезоксинуклеотида с помощью TDT присоединяется замещенный фосфатный остаток из исследуемого трифосфата. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% денатурирующем полиакриламидном геле.

Все синтезированные трифосфаты проявили субстратные свойства по отношению к TDT и оказались способными выступать в роли доноров замещенного фосфатного остатка в реакции элонгации олигодезоксинуклеотида. Соединения

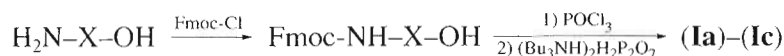


Схема 1.

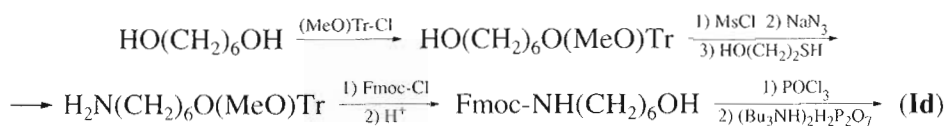


Схема 2.

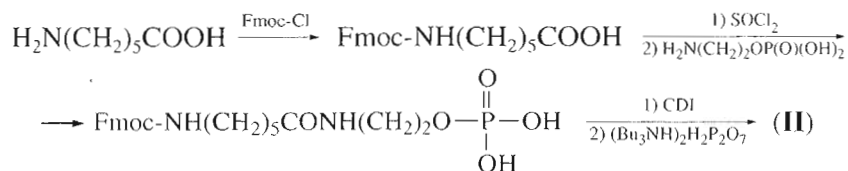


Схема 3.

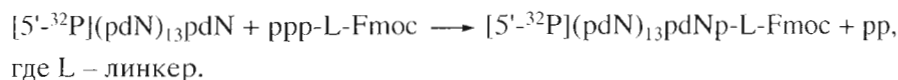
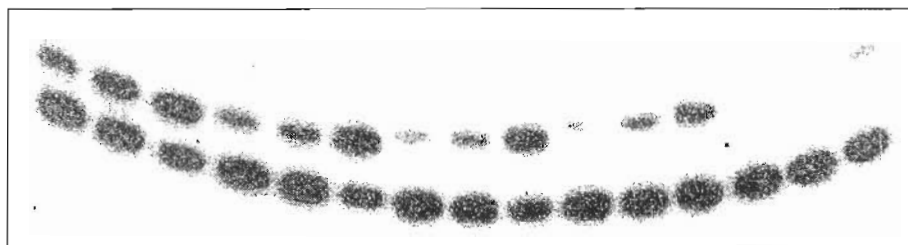


Схема 4.



мкМ	0.2 0.5 1	0.2 0.5 2	0.2 0.5 2	1 2 5	1 2 5
Соед.	dTTP	(Ia)	(Ic)	(Id)	(II)

Электрофореграмма продуктов реакции элонгации одноцепочечного олигодезоксинуклеотида при катализе TDT.

(Ia)–(Ic) показали сходные субстратные свойства, близкие к свойствам dTTP (рисунок): 50%-ная элонгация праймера наблюдалась при концентрации трифосфатов 1–2 мкМ (данные для (Ib) не приведены). Активность соединения (Id) была заметно ниже: при концентрации трифосфата 5 мкМ утилизация праймера не превышала 30%. При этой же концентрации встраивание замещенного монофосфата из трифосфата (II) не превышало 10%, а для соединения (III) степень утилизации праймера была еще меньше (данные не приведены).

Таким образом, субстратные свойства по отношению к TDT синтезированных трифосфатов, содержащих в качестве линкеров короткие алкильные фрагменты (Ia)–(Ic), практически не отличались друг от друга и были близки к таковым для dTTP. В случае увеличения длины линкера до шести углеродных атомов (Id) и более (II), (III) субстратные свойства заметно ухудшались. Трифосфаты с линкерами, представляющими собой алкильные фрагменты, оказались наиболее эффективными субстратами TDT. По эффективности элонгации олигодезоксинуклеотида изученные трифосфаты располагались в следующем порядке: dTTP ≈ (Ia) ≈ (Ib) > (Ic) > (Id) > (II) > (III).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы и растворители: 2-аминоэтанол, 4-аминобутанол, триэтилфосфат, трибутиламин, триэтиленгликоль, тионилхлорид, CDI, 2-меркаптоэтанол, гексаметилдисилазан, *N,O*-бис(триметилсилил)ацетамид (Fluka); 9-флуоренилметоксикарбонилхлорид, 3-аминопропанол, 2-аминоэтилфосфат, хлорокись фосфора, DMF (Aldrich). Для ферментативных реакций использовали какодилат натрия, дитиотреит, соль EDTA, акриламид, формамид и TDT из тимуса теленка (15 ед./мкл, Amersham). Олигонуклеотид был получен от фирмы “Синтол” (Россия).

Адсорбционную колоночную хроматографию проводили на LiChroprep RP-18 (25–40 мкм) и Kieselgel (63–100 мкм) фирмы “Merck”. Ионообмен-

ную колоночную хроматографию осуществляли на Dowex-50 WX8 (Fluka) в  $\text{NH}_4^+$ -форме. ТСХ осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Германия), элюирующая система диоксан–вода–25% водный  $\text{NH}_3$  (6 : 4 : 1).

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре AMX III-400 (Bruker) с рабочей частотой 400 МГц для  $^1\text{H}$ -ЯМР (приведены химические сдвиги ( $\delta$ , м.д.) относительно внутренних стандартов –  $\text{Me}_4\text{Si}$  для органических растворителей и 3-(триметилсилил)-1-пропансульфоната натрия (DSS) для  $\text{D}_2\text{O}$ ; КССВ приведены в герцах) и 162 МГц для  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (с подавлением фосфор-протонного спин-спинового взаимодействия, внешний стандарт – 85% фосфорная кислота).

***N*-(9-Флуоренилметоксикарбонил)-4-аминобутиловый эфир трифосфорной кислоты (Ic).** Раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (860 мг, 8 ммоль) в воде (8 мл) приливали к 4-аминобутанолу (186 мкл, 2 ммоль), прибавляли раствор 9-флуоренилметоксикарбонилхлорида (400 мг, 1.6 ммоль) в 1,4-диоксане (800 мкл) и перемешивали смесь 18 ч при комнатной температуре. Осадок целевого *N*-(9-флуоренилметоксикарбонил)-4-аминобутанола отфильтровывали и промывали водой. Выход *N*-(9-флуоренилметоксикарбонил)-4-аминобутанола 446 мг (93%).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.76 и 7.57 (4 H, 2д, *J* 7.5, H1, H4, H5, H8 (Fmoc)), 7.39 и 7.31 (4 H, 2м, H2, H3, H6, H7 (Fmoc)), 4.87 (1 H, уш. с, NH), 4.40 (2 H, д, *J* 6.8,  $\text{CH}_2$  (Fmoc)), 4.21 (1 H, т, *J* 6.8, H9 (Fmoc)), 3.66 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.23 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 1.55–1.45 (4 H, м,  $(\text{CH}_2)_2$ ).

Раствор *N*-(9-флуоренилметоксикарбонил)-4-аминобутанола (175 мг, 0.59 ммоль) в триэтилфосфате (1 мл) охлаждали до 0°C и прибавляли хлорокись фосфора (133 мкл, 1.43 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 18 ч при 5°C и при интенсивном перемешивании прибавляли смесь трибутиламина (1 мл, 4.3 ммоль) и 0.8 мМ раствора бис(трибутиламмоний)пирофосфата (3 мл, 2.4 ммоль) в DMF. Реакционную смесь перемешивали 3 ч при комнатной температуре, наносили на колонку (2 × 4 см) с Dowex-50, элюировали 50% водным метанолом (50 мл). Растворители удаляли в вакууме, остаток

хроматографировали на колонке (2 × 18 см) с LiChroprep RP-18 в градиенте концентрации метанола в воде (0 → 20%). Выход 40 мг (12%).  $R_f$  0.44.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 7.89, 7.64 (4 H, 2д,  $J$  7.5, H1, H4, H5, H8 (Fmoc)), 7.40, 7.48 (4 H, 2т,  $J$  7.5, H2, H3, H6, H7 (Fmoc)), 4.64 (2 H, д,  $J$  6.9,  $\text{CH}_2$  (Fmoc)), 4.20 (1 H, т,  $J$  6.9, H9 (Fmoc)), 3.94 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.02 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 1.55–1.23 (4 H, м,  $(\text{CH}_2)_2$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): –10.30 (1 P, д,  $J$  19.3,  $P^\gamma$ ), –10.38 (1 P, д,  $J$  20.3,  $P^\alpha$ ), –22.79 (1 P, дд,  $P^\beta$ ).

***N*-(9-Флуоренилметоксикарбонил)-2-аминоэтиловый эфир трифосфорной кислоты (Ia)** получали из 2-аминоэтанола по методике, описанной для эфира (Ic). Выход 40 мг (11%).  $R_f$  0.41.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 7.83, 7.69 (4 H, 2д,  $J$  7.5, H1, H4, H5, H8 (Fmoc)), 7.42, 7.36 (4 H, 2м, H2, H3, H6, H7 (Fmoc)), 4.35 (2 H, д,  $J$  6.5,  $\text{CH}_2$  (Fmoc)), 4.24 (1 H, т, H9 (Fmoc)), 4.06 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.44 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{N}$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): –8.20 (1 P, д,  $J$  19.8,  $P^\gamma$ ), –8.79 (1 P, д,  $J$  20.3,  $P^\alpha$ ), –20.73 (1 P, дд,  $P^\beta$ ).

***N*-(9-Флуоренилметоксикарбонил)-3-аминопропиловый эфир трифосфорной кислоты (Ib)** получали из 3-аминопропанола по методике, описанной для эфира (Ic). Выход 22 мг (7%).  $R_f$  0.42.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 7.83, 7.61 (4 H, 2д,  $J$  7.5, H1, H4, H5, H8 (Fmoc)), 7.41, 7.33 (4 H, 2 м, H2, H3, H6, H7 (Fmoc)), 4.69 (2 H, д,  $J$  6.9,  $\text{CH}_2$  (Fmoc)), 4.24 (1 H, т, H9 (Fmoc)), 3.82 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.03 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 1.65–1.53 (4 H, м,  $(\text{CH}_2)_2$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): –9.74 (1 P, д,  $J$  20.3,  $P^\gamma$ ), –10.48 (1 P, д,  $J$  19.3,  $P^\alpha$ ), –22.65 (1 P, дд,  $P^\beta$ ).

***N*-(9-Флуоренилметоксикарбонил)-8-амино-3,6-диоксаэтиловый эфир трифосфорной кислоты (III)**. К раствору триэтиленгликоля (10 г, 66.5 ммоль) в пиридине (50 мл) прибавляли монометокситритилхлорид (2.7 г, 8.9 ммоль), и реакционную смесь выдерживали 18 ч при 37°C. Продукт экстрагировали хлороформом в присутствии водного  $\text{NaHCO}_3$ . Хлороформные экстракты упаривали, остаток растворяли в пиридине (20 мл), охлаждали до 0°C и прибавляли метансульфонилхлорид (1.38 мл, 17.8 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 18 ч при 5°C, экстрагировали  $\text{CCl}_4$  в присутствии водного  $\text{NaHCO}_3$ . Органические экстракты упаривали, остаток растворяли в DMF (30 мл), прибавляли  $\text{NaN}_3$  (1.16 г, 17.8 ммоль). Реакционную массу перемешивали 5 ч при 90°C, растворитель удаляли в вакууме, остаток разбавляли водой (30 мл) и экстрагировали  $\text{CCl}_4$  (3 × 20 мл). Органические экстракты упаривали, остаток растворяли в DMF (30 мл), прибавляли меркаптоэтанол (3 мл) и 25% водный аммиак (0.5 мл), реакционную смесь выдерживали 18 ч при комнатной температуре, наносили на колонку (3 × 6 см) с Dowex-50, промывали колонку метанолом (50 мл), затем элюировали смесь метанолом (90 мл) и 25% водного аммиака (10 мл). Растворители упаривали, остаток соупаривали с пиридином (2 × 20 мл), растворяли в пиридине (20 мл) и прибавляли 9-флуо-

ренилметоксикарбонилхлорид (2.3 г, 8.9 ммоль). Через 18 ч при комнатной температуре реакционную смесь разбавляли водным  $\text{NaHCO}_3$  (30 мл) и экстрагировали  $\text{CCl}_4$  (3 × 20 мл). Органические слои упаривали, соупаривали с толуолом (2 × 20 мл) и прибавляли 80% водную уксусную кислоту (50 мл). Через 18 ч при комнатной температуре реакционную смесь упаривали и остаток хроматографировали на колонке (2 × 25 см) с силикагелем (63–100 мкм), элюировали 3% метанолом в хлороформе. Выход *N*-(9-флуоренилметоксикарбонил)-8-амино-3,6-диоксаоктан-1-ола составил 440 мг (13%).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ): 7.76, 7.60 (4 H, 2д,  $J$  7.5, H1, H4, H5, H8 (Fmoc)), 7.39, 7.31 (4 H, 2т,  $J$  7.5, H2, H3, H6, H7 (Fmoc)), 4.41 (2 H, д,  $J$  6.9,  $\text{CH}_2$  (Fmoc)), 4.21 (1 H, т,  $J$  6.9, H9 (Fmoc)), 3.70–3.56 (10 H, м,  $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.39 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{N}$ ).

К раствору *N*-(9-флуоренилметоксикарбонил)-8-амино-3,6-диоксаоктанола (220 мг, 0.59 ммоль) в триэтилфосфате (1 мл), охлажденному до 0°C, прибавляли хлорокись фосфора (133 мкл, 1.43 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 18 ч при 5°C и при интенсивном перемешивании прибавляли смесь трибутиламина (1 мл, 4.3 ммоль) и 0.8 мМ раствора бис(трибутиламмоний)пирофосфата (3 мл, 2.4 ммоль) в DMF. Реакционную смесь перемешивали 3 ч при комнатной температуре, наносили на колонку (2 × 4 см) с Dowex-50, промывали колонку 50% водным метанолом (50 мл). Растворители упаривали, остаток хроматографировали на колонке (2 × 18 см) с LiChroprep RP-18 в градиенте концентрации метанола в воде (0 → 20%). Выход 40 мг (11%).  $R_f$  0.36.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 7.80, 7.59 (4 H, 2д,  $J$  7.5, H1, H4, H5, H8 (Fmoc)), 7.41, 7.33 (4 H, 2т,  $J$  7.5, H2, H3, H6, H7 (Fmoc)), 4.47 (2 H, м,  $\text{CH}_2$  (Fmoc)), 4.18 (1 H, м, H9 (Fmoc)), 4.02 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 3.64–3.38 (8 H, м,  $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$ ), 3.11 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{N}$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): –9.76 (1 P, д,  $J$  19.3,  $P^\gamma$ ), –10.49 (1 P, д,  $J$  19.3,  $P^\alpha$ ), –22.49 (1 P, т,  $J$  19.3,  $P^\beta$ ).

***N*-(9-Флуоренилметоксикарбонил)-6-аминогексильный эфир трифосфорной кислоты (Id)** был синтезирован из 1,6-гександиола по методике, описанной для соединения (III). Выход 28 мг (8%).  $R_f$  0.45.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 7.94, 7.71 (4 H, 2д,  $J$  7.5, H1, H4, H5, H8 (Fmoc)), 7.53, 7.45 (4 H, 2т,  $J$  7.5, H2, H3, H6, H7 (Fmoc)), 4.69 (2 H, д,  $J$  6.8,  $\text{CH}_2$  (Fmoc)), 4.34 (1 H, т, H9 (Fmoc)), 3.89 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.03 (2 H, м,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 1.63–1.19 (8 H, м,  $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{N}$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): –10.15 (1 P, д,  $J$  19.3,  $P^\gamma$ ), –10.24 (1 P, д,  $J$  20.3,  $P^\alpha$ ), –22.67 (1 P, дд,  $P^\beta$ ).

***N*-[(9-Флуоренилметоксикарбонил)аминогексанонил]-2-аминоэтиловый эфир трифосфорной кислоты (II)**. К раствору 6-аминогексановой кислоты (260 мг, 2 ммоль) в водном  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (860 мг, 8 ммоль, 8 мл) прибавляли раствор 9-флуоренилметоксикарбонилхлорида (400 мг, 1.6 ммоль) в диоксане (800 мкл), выдерживали 18 ч при комнатной температуре, разбавляли водой до 100 мл и экстрагировали эфиром (3 × 20 мл). К водной

фракции (рН 10) добавляли 1 М НСl до рН 5. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Получили 721 мг (93%) (9-флуоренилметоксикарбонил)аминогексановой кислоты.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.75, 7.58 (4 Н, 2д,  $J$  7.5, Н1, Н4, Н5, Н8 (Fmoc)), 7.53, 7.45 (4 Н, 2т,  $J$  7.5, Н2, Н3, Н6, Н7 (Fmoc)), 4.87 (1 Н, уш. с, NH), 4.39 (2 Н, д,  $J$  6.5,  $\text{CH}_2$  (Fmoc)), 4.21 (1 Н, т,  $J$  6.5, Н9 (Fmoc)), 3.19 (2 Н, м,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.35 (2 Н, м,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.64–1.36 (6 Н, м,  $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{N}$ ).

2-Аминоэтилфосфат (52 мг, 0.3 ммоль) кипятили в *N,O*-бис(триметилсилил)ацетамиде (3 мл) в течение 10 ч. Растворитель упаривали, остаток растворяли в смеси гексаметилдисульфата (1 мл) и DMF (1 мл). К раствору (9-флуоренилметоксикарбонил)аминогексановой кислоты (78 мг, 0.2 ммоль) в хлористом метиле (5 мл) прибавляли тионилхлорид (220 мкл, 3 ммоль) и смесь перемешивали 3 ч при комнатной температуре, упаривали, остаток растворяли в DMF (3 мл) и прибавляли к раствору силилированного 2-аминоэтилфосфата. Реакционную массу перемешивали 12 ч при комнатной температуре и упаривали. Остаток растворяли в DMF (5 мл), добавляли CDI (324 мг, 2 ммоль) и перемешивали 5 ч, затем добавляли 0.23 мМ раствор бис(трибутиламмоний)пирофосфата (3.5 мл, 0.8 ммоль) в DMF. Перемешивали реакционную массу 3 ч при комнатной температуре, наносили на колонку (2 × 4 см) с Dowex-50, промывали колонку 50% водным метанолом (50 мл). Растворители упаривали, хроматографировали на колонке (2 × 18 см) с LiChroprep RP-18 в градиенте концентрации метанола в воде (0 → 20%). Выход 18 мг (14%).  $R_f$  0.46.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 7.67, 7.47 (4 Н, 2д,  $J$  7.5, Н1, Н4, Н5, Н8 (Fmoc)), 7.53, 7.45 (4 Н, 2т,  $J$  7.5, Н2, Н3, Н6, Н7 (Fmoc)), 4.21 (2 Н, д,  $J$  6.8,  $\text{CH}_2$  (Fmoc)), 4.04 (1 Н, т,  $J$  6.8, Н9 (Fmoc)), 3.86 (2 Н, м,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.25 (2 Н, м,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OP}$ ), 2.85 (2 Н, м,  $\text{CH}_2\text{NHCO}_2$ ), 2.19 (2 Н, м,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.53–1.10

(6 Н, м,  $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{N}$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ): –10.24 (1 P, д,  $J$  20.3, P<sup>γ</sup>), –10.64 (1 P, д,  $J$  19.3, P<sup>α</sup>), –22.67 (1 P, дд, P<sup>β</sup>).

**Субстратная активность синтезированных соединений.** Меченый олигонуклеотид получали по методике, описанной ранее [3]. Реакционная смесь в объеме 10 мкл содержала 0.02 мкМ  $5'$ - $^{32}\text{P}$ -меченный 14-звенный олигодезоксинуклеотид, 0.2 ед. акт. TDT, 100 мМ какодилат натрия (рН 7.2), 2 мМ  $\text{CoCl}_2$ , 0.1 мМ дитиотреит и субстраты в различных концентрациях. Реакционную смесь инкубировали в течение 10 мин при 37°C. Реакции останавливали добавлением 5 мкл формамида, содержащего 0.5 мМ EDTA и 0.1% фенолового синего и ксиленцианола. Продукты разделяли в 15% денатурирующем полиакриламидном геле. Гели экспонировали с рентгеновской пленкой Кодак RX. Для количественной оценки радиоавтограф сканировали на приборе Molecular Dynamics 300A Computing densitometer.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 04-04-49621. Авторы благодарны Е.А. Широковой и Ю.С. Скоблову за помощь в написании статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baltimore D. // Nature (London). 1974. V. 248. P. 409–411.
2. Arzumanov A.A., Victorova L.S., Jasko M.V. // Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids. 2000. V. 19. P. 1787–1793.
3. Arzumanov A.A., Victorova L.S., Jasko M.V., Yesipov D.S., Krayevsky A.A. // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 1276–1281.
4. Khandazhinskaya A.L., Jasko M.V., Shirokova E.A., Kukhanova M.K. // Collection Symposium Series. 2002. V. 5. P. 344–347.
5. Ludwig I. // Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 1981. V. 16. P. 131–133.

## New Nonnucleoside Substrates for Terminal Deoxynucleotidyl Transferase: the Synthesis and the Dependence of Substrate Properties on Structure

A. L. Khandazhinskaya<sup>#</sup>, M. K. Kukhanova, and M. V. Jasko

<sup>#</sup>Phone: (095) 135-2255; fax: (095) 135-1405; e-mail: khandazhinskaya@bk.ru  
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,  
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

*N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)- $\omega$ -aminoalkyl, *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-8-amino-3,6-dioxaoctyl, and *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-6-aminohexanoyl]-2-aminoethyl triphosphates were synthesized. All of them were shown to be the substrates of the calf thymus terminal deoxynucleotidyl transferase. Their substrate properties depend on the length and structure of linker between the 9-fluorenylmethoxycarbonyl and triphosphate moieties. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* nucleoside triphosphate analogues, substrate properties, terminal deoxynucleotidyl transferase