



УДК 577.113.3.057

СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ 3'-КАРБАМОЙЛНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТИМИДИНА

© 1995 г. Ю. Г. Боресков, Ю. А. Берлин*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 13.01.95 г.

Описан синтез ряда флуоресцентных 3'-уретанов тимицина путем взаимодействия соответствующего 3'-карбонилимидазолида с аминоалкильными производными флуоресцина, аминофенилбензоксазола и пирена.

Ключевые слова: флуоресцентные метки, карбонилдимидазол, уретаны, нуклеозиды.

Цветовая дифференциация фрагментов ДНК с помощью флуоресцентных меток позволяет усовершенствовать многие молекулярно-биологические методы анализа. Наиболее ярко это реализуется в однодорожечном секвенировании ДНК (полосы четырех цветов, отвечающих четырем различным нуклеотидным звеньям, в одной дорожке геля) [1] и селективной детекции точечных мутаций в медицинской диагностике [2]. Флуоресцентно детектируемые полинуклеотиды могут быть получены в качестве продуктов ДНК-полимеразной достройки 5'-меченых олигонуклеотидных праймеров [3] или же с использованием модифицированных по нуклеозидному остатку dNTP, блокирующих elongацию цепи ДНК [4].

Меченные dNTP-терминаторы обладают рядом преимуществ по сравнению с мечеными праймерами. Прежде всего они универсальны, поскольку могут использоваться с любыми немодифицированными праймерами. К тому же реакции полимеразной достройки с участием нескольких терминаторов, меченых разными красителями, могут проводиться в одной реакционной смеси. Введение репортерных групп в dNTP и праймеры по-разному оказывается на их субстратных свойствах по отношению к полимеразе. В то время как реакционная способность химически модифицированных праймеров практически не меняется, особенно в случае 5'-терминально меченых праймеров, специфичность нерадиоактивно меченых dNTP значительно снижается. При этом существенное значение могут иметь положение репортерной группы в составе нуклеозидтрифосфатов и ее свойства. Так, введение даже довольно объемистых заместителей по 5'-му положению

пиридицина и по 7-му положению пурина все же не препятствует специальному встраиванию соответствующих дидезоксинуклеотидов некоторыми ДНК-полимеразами в ходе матричной полимеразной реакции [5]. Аналогичные данные получены для некоторых производных дезоксикулеотидов по 3'-гидроксилу [6].

В настоящей работе описываются синтез и спектральные свойства ряда 3'-карбамоильных производных тимицина, замещенных по карбамоильной группе остатками флуоресцина, аминофенилбензоксазола или пирена, как потенциальных терминаторов при полимеразной достройке праймеров. Выбор флуоресцентных меток определялся не только их спектральными характеристиками, но и различной способностью к интеркаляции в ДНК, что может влиять на субстратные свойства нерадиоактивно меченых dNTP.

Соединения этого типа подобно другим аналогам 2'-дезоксинуклеозидов, модифицированным по 3'-положению, интересны не только как реагенты для секвенирования ДНК, но и как потенциальные химиотерапевтические средства с противовирусной или противоопухолевой активностью (см., например, обзор [7]): так, известно, что наличие карбаматной функции способствует проникновению нуклеозидных аналогов через биологические мембранны и во многом определяет их фармакологическую активность [8]. Описана также иммобилизация нуклеозидов с помощью 3'-уретановой группы на носителе для твердофазного олигонуклеотидного синтеза [9], однако метод не получил распространения из-за устойчивости этой группы при деблокировании водным аммиаком.

В качестве источника метки при синтезе флуоресцентных производных тимицина мы использовали аминоалкильные производные упомянутых выше красителей с линкерами различной

Сокращения: FITC – флуоресцеинизотиоцинат, DMT – 4,4'-диметокситритил, DMF – диметилформамид, CDI – карбонилдимидазол, DMAP – 4-(диметиламино)пиридин, FAB – ионизация ускоренными атомами.

* Автор для переписки.

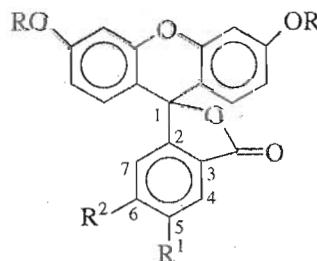
длины (соединения IX, X, XII, XIV, XVII, XX). Метки на основе флуоресцина получали двумя путями: из FITC (смесь 5- и 6-изомеров) и индивидуального 5-аминофлуоресцина с защищенными гидроксильными группами (соединения V и VI). Так, из реакционной смеси, полученной в результате обработки FITC N-трифторацетилгексаметилендиамином, хроматографически выделили 5-флуоресцинильное производное (XIII) и после отщепления трифторацетильной группы мягким аммонолизом получили соответствующую аминогексилтиомочевину (XIV).

Исходным соединением для второй разновидности меток служил 5-нитрофлуоресцин (I), полученный наряду с 6-изомером сплавлением реозрина и 4-нитрофталевой кислоты [10] и после ацетилирования продуктов реакции и дробной кристаллизации выделенный в виде диацетата (III). Представлялось целесообразным при дальнейших превращениях сохранить O-ацетильные группы, чтобы снизить вероятность побочных реакций и улучшить растворимость красителя. Однако восстановление диацетата (III) действием $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, TiCl_3 или SnCl_2 в значительной степени сопровождалось дезацетилированием, и лишь использование в качестве восстановителя смеси тонкодисперсного алюминия и $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [11] привело с высоким выходом к диацетату аминофлуоресцина (V). Следует отметить, что соответствующий дibenзоат (IV) при восстановлении двуххлористым оловом сохранил O-защитные группы.

Для введения в молекулу флуоресцина линкера, содержащего алифатическую аминогруппу, которая предназначена для последующего связы-

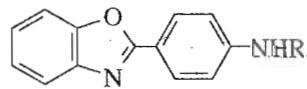
вания с нуклеозидом, 5-аминофлуоресцин с ацетилированными или бензоилированными гидроксилами (соответственно соединения (V) и (VI)) N-ацилировали N-Вос-защищенной 6-аминокапроновой кислотой и Вос-группу селективно удаляли смесью муравьиной и трифторуксусной кислот. В результате были получены ω -аминоалкильные производные (IX) и (X), использованные затем для введения остатка флуоресцина в защищенный тимидин. Обработкой соединения (IX) активированным эфиrom 6-N-Вос-аминокапроновой кислоты с последующим деблокированием получили репортную группу с удвоенным спейсером (XII). Аналогично из аминофенилбензоксазола (XV) было получено аминокапронильное производное (XVII). Реагент (XX) для введения ширенильного остатка синтезировали путем моноацилирования тетраметилендиамина пентафторфениловым эфиrom 4-(1-пиренил)масляной кислоты (XIX).

3'-Карбамоильную группировку вводили в молекулу 5'-O-диметокситритильтимидина (XXI), активируя 3'-гидроксил с помощью карбонитридиimidазола. Этот реагент ранее использовался для двухэтапной дериватизации олигонуклеотидов [12]: сначала в олигонуклеотид вводили аминолинкер, содержащий также функциональные группы (тиольную [13], карбоксильную [14] или дополнительные аминоалкильные [15, 16]), по которым затем вводили репортные группы. Мы нашли, что если репортную группу сначала присоединить к аминосодержащему спейсеру, то продукт такого взаимодействия может реагировать непосредственно с активированным 3'-гидроксилом; тем самым сводится к минимуму число реакций

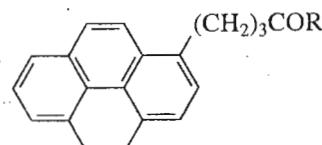


- (I) $R = H$, $R^1 = \text{NO}_2$, $R^2 = H$
 (II) $R = \text{Ac}$, $R^1 = H$, $R^2 = \text{NO}_2$
 (III) $R = \text{Ac}$, $R^1 = \text{NO}_2$, $R^2 = H$

- (IV) $R = \text{Bz}$, $R^1 = \text{NO}_2$, $R^2 = H$
 (V) $R = \text{Ac}$, $R^1 = \text{NH}_2$, $R^2 = H$
 (VI) $R = \text{Bz}$, $R^1 = \text{NH}_2$, $R^2 = H$
 (VII) $R = \text{Ac}$, $R^1 = \text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NHBOC}$, $R^2 = H$
 (VIII) $R = \text{Bz}$, $R^1 = \text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NHBOC}$, $R^2 = H$
 (IX) $R = \text{Ac}$, $R^1 = \text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, $R^2 = H$
 (X) $R = \text{Bz}$, $R^1 = \text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, $R^2 = H$
 (XI) $R = \text{Ac}$, $R^1 = \text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NHBOC}$, $R^2 = H$
 (XII) $R = \text{Ac}$, $R^1 = \text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$, $R^2 = H$
 (XIII) $R = H$, $R^1 = \text{NHCSNH}(\text{CH}_2)_6\text{NHCOCF}_3$, $R^2 = H$
 (XIV) $R = H$, $R^1 = \text{NHCSNH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$, $R^2 = H$



- (XV) $R = H$
 (XVI) $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_5\text{NHCOCF}_3$
 (XVII) $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$



- (XVIII) $R = \text{OH}$
 (XIX) $R = \text{OC}_6\text{F}_5$
 (XX) $R = \text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$

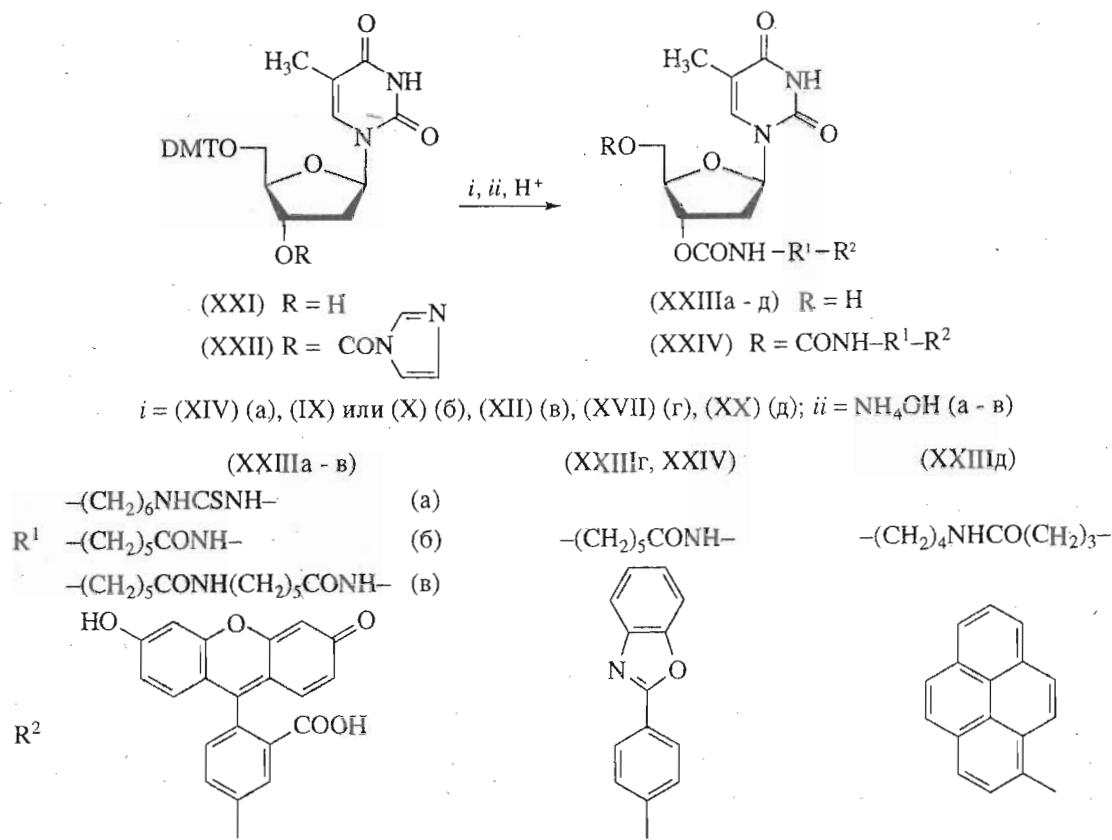


Схема.

с участием нуклеозида, который в общем случае является наиболее труднодоступным компонентом.

При 3'-модификации защищенноготимидина (XXI) (схема) его 3'-O-карбонилимидазолид (XXII) вводили в реакцию с флуоресцентными метками, содержащими алифатическую аминогруппу. Оказалось, что аминогруппа спейсера, уже модифицированного репортерной группой, менее реакционноспособна по отношению к соединению (XXII), чем такая же группа в составе незамещенного линкера, поэтому для полного протекания реакции потребовался основный растворитель и активатор. Лучшие результаты были получены при использовании пиридина и DMAP (2 ч при комнатной температуре, 3-кратный избыток имидазолида (XXII) по отношению к аминокомпоненту, метод А). При проведении реакции в DMF более эффективным активатором оказался тетразол, однако при этом образуется до 40% побочного продукта (метод Б). В УФ-спектре этого продукта, полученного при реакции в DMF 3'-O-карбонилимидазолида тимидина (XXII) с бензоксазольным производным (XVII), соотношение $\epsilon_{320}/\epsilon_{260}$ заметно выше, чем в случае конъюгата (XXIIIg) – единственного продукта, образующегося при взаимодействии этих же соединений в пиридине. Это позволило предположить, что побочное вещество (XIV) представляет собой продукт 3',5'-бис-кар-

бамилирования тимидина, по-видимому, образовавшийся в результате промежуточного 5'-детриирирования соединений (XXI) или (XXII) под действием тетразола и $3' \rightarrow 5'$ -перекарбамоилирования. Действительно, это вещество было получено из тимидина в результате его последовательной обработки CDI и тем же бензоксазольным производным (XVII). Следует отметить, что ароматические амины с имидазоликарбонилтимином (XXII) практически не реагируют.

Уретаны (XXIII) были выделены препартивной ТСХ на силикагеле. Их строение было подтверждено с помощью спектральных данных. Масс-спектры дали ожидаемые пики молекулярных ионов (таблица). УФ-спектры (рис. 1 и 2) в

Характеристики уретанов (XXIIIa - д)

Характеристика	(а)	(б)	(в)	(г)	(д)
R_f (система В)	0.38	0.36	0.29	0.79	0.95
$M (m/z)$	900*, 2*	728 ^{2*}	842 ^{2*}	592 ^{3*}	627 ^{3*}
Выход, %	45 ^{4*}	83	71	86	49 ^{4*}

* Для N,O-триацетата (получен действием Ac_2O в Py).

^{2*} Ионизация осколками деления $^{252}\text{Cf} (M^+)$.

^{3*} Ионизация ускоренными атомами ксенона ($[M + 1]^+$).

^{4*} Метод Б.

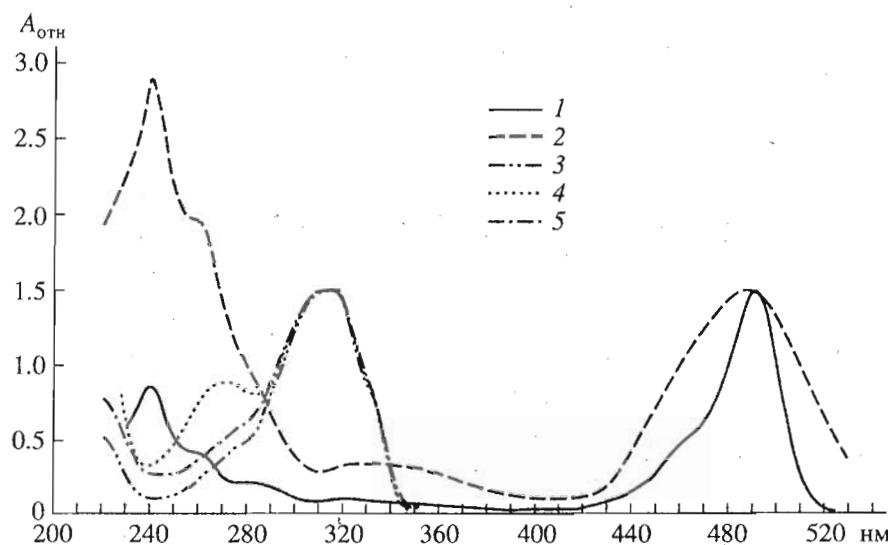


Рис. 1. Относительные спектры поглощения производных флуоресцина (0.08 М трис-борат, pH 8.3, ϵ_{490} 56200 M⁻¹ cm⁻¹) и бензоксазола (метанол, ϵ_{315} 37700 M⁻¹ cm⁻¹): 1 – N-(5-флуоресцинил)-N¹-(6-аминогексил)тиомочевина (XXIIIa); 2 – 3'-O-[5-(5-флуоресциниламинокарбонил)пентиламинокарбонил]тимидин (XXIIIb); 3 – 2-[4-(6-N-трифторацетиламиногексаноил)аминофенил]бензоксазол (XVI); 4 – 3'-O-[5-[4-(2-бензоксазолил)фениламинокарбонил]пентиламинокарбонил]тимидин (XXIIIc); 5 – 3',5'-O-бис[5-[4-(2-бензоксазолил)фениламинокарбонил]пентиламинокарбонил]тимидин (XXIV).

основном повторяют спектры исходных флуоресцентных красителей, за исключением уширения полосы поглощения флуоресцинового остатка в видимой области у соединений (XXIIIa - в) и несколько большего поглощения в области 260 нм у всех уретанов, обусловленного вкладом тимицина.

Таким образом, 3'-имидаэолиды нуклеозидов могут быть выделены в индивидуальном состоя-

нии и использованы для получения 3'-O-модифицированных нуклеозидов. Применение аналогичного подхода при стандартном твердофазном синтезе олигонуклеотидов в направлении 3' → 5' позволяет вводить метку по 5'-концу олигонуклеотидов, что было показано нами ранее [17].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 6-аминогексановую кислоту, 6-N-*трет*-бутоксикарбониламиногексановую кислоту, 5'-O-диметокситритилтимидин (НПО "Биолар", Олайне), DCC (Aldrich), муравьиную кислоту (Merck), FITC (смесь 5- и 6-изомеров), CDI, пивалоилхлорид (Fluka), тетразол (т. пл. 154°C) (Sigma). DMF (ч.) сушили над P₂O₅ и дважды перегоняли в вакууме. Диоксан и хлороформ перед использованием пропускали через слой активированной (3 ч при 200°C) окиси алюминия. 4-Нитрофталевую кислоту получали нитрованием фталимида [18]. 4-(1-Пиренил)бутановая кислота (XVIII) и 2-(4-аминофенил)бензоксазол (XV) были любезно предоставлены В.А. Коршуном (ИБХ РАН).

Флеш-хроматографию проводили на колонке (3 × 5 см) с силикагелем Kieselgel 60 (Merck); ТСЖ – на пластинах Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) в следующих системах растворителей: хлороформ–этанол, 19 : 1 (A), 9 : 1 (B), 8 : 2 (B); изопропанол–25% аммиак–вода, 7 : 1 : 2 (Г); хлороформ–ацитонитрил, 5 : 6 (Д); гексан–ацетон, 1 : 1 (E); этилацетат–25% уксусная кислота–ацитонитрил, 5 : 3 : 3.5 (Ж); этилацетат–

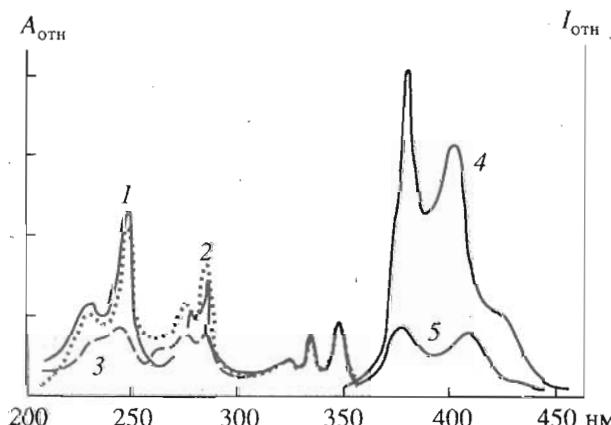


Рис. 2. Относительные спектры поглощения (1 - 3) и флуоресценции (4 - 5, $\lambda_{\text{возб}}$ 340 нм) производных пирена: 1, 4 – 1.3 × 10⁻⁵ М N-[4-(1-пиренил)бутирил]-N¹-(тимидин-3'-O-карбонил)тетраметиллендиамин (XXIIIд) в метаноле; 2 – 1.3 × 10⁻⁵ М соединение (XX) в метаноле; 3, 5 – 1.3 × 10⁻⁵ М соединение (XXIIIд) в 0.08 М трис-борате, pH 8.3, содержащем 10% метанола.

25% уксусная кислота–вода–этанол, 5 : 1 : 1 : 2 (И). Масс-спектры получены на приборах Kratos MS 50 TC (ионизация ускоренными атомами ксенона) (FAB) и времяпролетном масс-спектрометре МСБХ (ПО “Электрон”, Сумы) с ионизацией осколками деления ^{252}Cf и плазменной десорбцией. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре Gilford 2400-2, флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4. ИК-спектры регистрировали на приборе UR-20 в таблетке с КВг или в суспензии в вазелиновом масле.

N-Трифторацетилгексаметилендiamин получали обработкой гексаметилендамина этиловым эфиром трифтормуксусной кислоты по методу [19] и выделяли перегонкой в вакууме; собирали фракцию с т. кип. 180 – 210°C (10 мм рт. ст.). Выход 23%, т. пл. 56°C (52°C [19]), R_f 0.19 (E).

Этиловый эфир трифтормуксусной кислоты получен в результате взаимодействия эквимольных количеств трифтормуксусного ангидрида и абс. этанола при 0°C; при перегонке собирали фракцию с т. кип. 56 – 62°C, которую пропустили через тонкий слой окиси алюминия.

N-(5-Флуоресцеинил)-N'-(6-аминогексил)тиомочевина (XIV). Раствор 100 мг (0.26 ммоль) FITC (Ia, б) и 55 мг (0.26 ммоль) N-трифторацетилгексаметилендамина в 0.6 мл DMF выдержали ночь при комнатной температуре и хроматографировали в градиенте концентрации метанола (0 – 30%) в хлороформе. Выделили 66 мг (43%) N-(5-флуоресцеинил)-N'-(N-трифторацетил-6-аминогексил)-тиомочевины (XIII), R_f 0.75 (Б). После аммонолиза (25% водный NH₃-MeOH, 1 : 1; 5 ч при 20°C), упаривания и флеш-хроматографии в системе Д выделили 18 мг соединения (XIV) (общий выход 13%), R_f 0.57 (Г). Масс-спектр триацетата (Ac₂O + Py, 1 ч при 20°C) соединения (XIV) (FAB), m/z : 632 (M^+).

5-Нитрофлуоресцеиндиацетат (III) получен из 4-нитрофталевой кислоты и резорцина по методу [10] после дробной кристаллизации из уксусного ангидрида. Выход 20%, т. пл. 224 – 225°C (221 – 222°C [10]), R_f 0.69 (Д); масс-спектр, m/z : 461 (M^+), 417 ($[M - COO]^+$), 375 ($[M + 1 - COO - Ac]^+$), 332 ($[M + 1 - COO - 2Ac]^+$); ИК-спектр, см⁻¹: 1760 (CO_{лакт}, OCOMe), 1600, 1530 (NO₂), 1490, 1410, 1370, 1350 (NO₂), 1230 (C–O). В ходе кристаллизации выделен также изомерный 6-нитрофлуоресцеиндиацетат (II); выход 18%, R_f 0.66 (Д), т.пл. 178 – 179°C (189 – 190°C [10]); масс-спектр совпадает со спектром 5-изомера.

5-Нитрофлуоресцеин (I) получен щелочной обработкой соединения (III) [10], R_f 0.65 (Б); ИК-спектр, см⁻¹: 1590, 1350 (NO₂), 1230 (C–O).

5-Нитрофлуоресцеиндибензоат (IV) получен бензоилированием (BzCl + Py, 1 ч при 20°C) соединения (I). Выход 52%; т. пл. 219 – 221°C, R_f 0.91 (А), масс-спектр, m/z : 585 (M^+), 541($[M - COO]^+$),

524, 436 ($[M - COO - COPh]^+$); ИК-спектр, см⁻¹: 1760 (CO_{лакт}), 1730 (OCOPh), 1600, 1340 (NO₂), 1230 (C–O).

5-Аминофлуоресцеиндиацетат (V). А. *Модифицированный метод* [11]. Растирную смесь 2.3 г (0.01 моль) NiCl₂ · 6H₂O и 2.4 г (0.1 моль) Al-пудры прибавляли к раствору 2.3 г (5 ммоль) 5-нитрофлуоресцеиндиацетата (III) в 150 мл ацетона, кипятили при перемешивании 15 мин, по охлаждении раствор деканттировали, осадок экстрагировали хлороформом в приборе Сокслета в течение 5 ч. Объединенные растворы пропускали через тонкий слой силикагеля и упаривали. Выход 2.0 г (93%), т. пл. 132 – 133°C, R_f 0.84 (Б). Масс-спектр, m/z : 431 (M^+), 387 ($[M - COO]^+$), 344 ($[M - COO - Ac]^+$), 302 ($[M + 1 - COO - 2Ac]^+$). ИК-спектр, см⁻¹: 1750 (CO_{лакт}, OCOMe), 1600, 1480, 1410, 1320 (NH₂), 1220 (C–O).

Б. Раствор 4.6 г (0.01 моль) 5-нитрофлуоресцеиндиацетата (III) и 8.8 г (0.04 моль) SnCl₂ в смеси 25 мл ацетона и 25 мл этанола кипятили 10 мин (контроль ТСХ в системе Б). По охлаждении прибавляли 50 мл ацетона, 9 мл (0.16 моль) уксусной кислоты и при непрерывном перемешивании 12 г (0.05 моль) Na₂S · 9H₂O. Перемешивали еще 5 мин, фильтровали через кизельгур, сорбент промывали ацетоном (3 × 20 мл), объединенные фильтраты упаривали, остаток растворяли в хлороформе, промывали водой, сушили Na₂SO₄ и упаривали. Выход амина (V) 2.15 г (50%).

5-Аминофлуоресцеиндибензоат (VI) получен аналогично из нитросоединения (IV) по методу Б. Выход 90%, R_f 0.50 (А).

5-[(6-N-Вос-аминогексаноил)амино]флуоресцеиндиацетат (VII). К раствору 0.51 г (2.2 ммоль) 6-N-Вос-аминогексановой кислоты в 3 мл пиридина прибавляли 0.27 мл пивалоилхлорида, выдерживали 5 мин и прибавляли 0.86 г (2 ммоль) 5-аминофлуоресцеиндиацетата (V). Через 30 мин упаривали, растворяли в 15 мл хлороформа, промывали 0.5 M NaHCO₃ (2 × 3 мл), сушили Na₂SO₄ и хроматографировали в градиенте концентрации метанола (0 → 2%) в хлороформе. Выход 1.1 г (86%), т. пл. 79°C, R_f 0.85 (А); масс-спектр (FAB), m/z : 645 ($[M + 1]^+$).

5-[(6-N-Вос-аминогексаноил)амино]флуоресцеиндибензоат (VIII). Раствор 1.0 г (1.8 ммоль) 5-аминофлуоресцеиндибензоата (VI), 1.8 г (8 ммоль) 6-N-Вос-аминогексановой кислоты, 1.6 г (8 ммоль) DCC и 0.5 мл триэтиламина в 5 мл тетрагидрофурана выдерживали 12 ч при 40°C (контроль ТСХ), разбавляли равным объемом ацетона, отфильтровывали, фильтрат упаривали и остаток перекристаллизовывали из гексана. Получили 0.9 г (65%) соединения (VIII), R_f 0.39 (А).

5-[(6-Аминогексаноил)амино]флуоресцеиндиацетат (IX). К раствору 0.61 г Вос-производного

(VII) в 1 мл муравьиной кислоты добавляли 0.1 мл 50% водной CF_3COOH , выдерживали 0.5 ч при 20°C и упаривали. Выход 0.51 г (98%), R_f 0.46 (Ж); масс-спектр (FAB), m/z : 546 ($[M + 2]^+$), 504 ($[M + 2 - \text{Ac}]^+$), 462 ($[M + 2 - 2\text{Ac}]^+$).

5-[(6-Аминогексаноил)амино]флуоресцеинди-бензоат (X) получен при обработке 0.3 г Вос-производного (VIII) 1 мл CF_3COOH (0.5 ч при 20°C) и хроматографии в системе Е. Выход 0.18 г (69%), R_f 0.51 (Ж).

Пентафторфениловый эфир 6-N-Вос-амино-гексановой кислоты (XXV). Раствор 23.1 г (0.10 моль) 6-N-Вос-амино-гексановой кислоты, 20 г (0.11 моль) пентафторфенола и 22.7 г (0.11 моль) DCC в 40 мл сухого этилацетата выдерживали 1 ч при 20°C, фильтровали, фильтрат упаривали и остаток перекристаллизовывали из гексана. Получили 26 г соединения (XXV), т. пл. 76°C; из маточного раствора выделили дополнительно 3.4 г. Общий выход 74%, масс-спектр, m/z : 397 (M^+), 324 ($[M - t\text{-BuO}]^+$), 296 ($[M - t\text{-BuOCO}]^+$); ИК-спектр, cm^{-1} : 3370 (NH), 1760 (сложноЭФ. CO), 1670 (амид I), 1510 (амид II), 1260 (амид III).

5-[(6-N-(6-N-Вос-амино-гексаноил)амино-гексаноил)амино]флуоресцеиндиацетат (XI). Раствор 272 мг (0.5 моль) амина (IX) и 200 мг (0.5 моль) пентафторфенилового эфира (XXV) в 3 мл ацетона выдерживали 1 ч при 20°C и хроматографировали в градиенте концентрации метанола (0 → 5%) в хлороформе. Выход производного (XI) 163 мг (71%), R_f 0.76 (A); масс-спектр (FAB), m/z : 758 ($[M + 1]^+$).

5-[(6-N-(6-Аминогексаноил)амино-гексаноил)-амино]флуоресцеиндиацетат (XII) получен деблокированием N-Вос-производного (XI) аналогично соединению (IX). Выход 68%, R_f 0.80 (Ж).

2-[4-(6-N-Трифторацетиламино-гексаноил)амино-фенил]бензоксазол (XVI). Раствор 0.68 г (3 моль) 6-N-трифторацетиламино-гексановой кислоты (получена по методу [20]) и 0.31 г (1.5 моль) DCC в 5 мл этилацетата перемешивали 1 ч, выпавшую мочевину отфильтровывали, к фильтрату добавляли 0.21 г (1 моль) 2-(4-амино-фенил)бензоксазола (XV) и кипятили 1 ч. По охлаждении выкристаллизовалось 0.212 г соединения (XVI); из маточного раствора выделяли еще 0.162 г. Общий выход 79%, т. пл. 210°C (этилацетат); масс-спектр, m/z : 419 (M^+). УФ-спектр (метанол), λ_{\max} , нм (ε): 315 (37700). $R_{(XV)}$ 0.80 (A).

2-[4-(6-Аминогексаноил)амино-фенил]бензоксазол (XVII). К раствору 0.26 г трифторацетильного производного (XVI) в 2 мл пиридина добавляли 3 мл 10 М водного KOH, выдерживали 3 ч при 20°C и осаждали 50 мл воды. Выход 197 мг (99%), т. пл. 253°C, $R_{(XVII)}$ 0.27 (И).

Пентафторфениловый эфир 4-(1-пиренил)бутановой кислоты (XIX) получен аналогично соединению (XXV) из 1 г (3.5 моль) 4-(1-пиренил)бутановой кислоты (XVIII), 0.7 г (3.8 моль) пентафторфенола и 0.8 г (3.8 моль) DCC в 7 мл диоксана (12 ч при 20°C). После кристаллизации из 5 мл смеси гексан-диоксан (1 : 1) выход продукта (XIX) 0.51 г (32%), т. пл. 131 - 132°C (135 - 136°C [21]), $R_{(XVIII)}$ 1.18 (E).

N-[4-(1-Пиренил)бутирил]тетраметилендиамин (XX). К раствору 200 мг (2.2 моль) тетраметилендиамина в 5 мл сухого хлороформа добавляли раствор 100 мг (0.22 моль) пентафторфенилового эфира (XIX) в 5 мл хлороформа. Через 15 мин реакционную смесь промывали водой (2 × 50 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали, наносили на колонку с силикагелем, промывали 20% раствором метанола в хлороформе (10 мл) и затем продукт ацилирования (XX) элюировали смесью хлороформ-метанол-25% водный NH_3 (20 : 5 : 1). Выход 38 мг (48%), т. пл. 173 - 177°C; масс-спектр, m/z : 358 ($[M - 1]^+$).

5'-О-Диметокситритил-3'-О-(1-имидацолилкарбонил)тимидин (XXII). Раствор 1.13 г (2.07 моль) 5'-О-диметокситритилтимидина (XXI) и 0.6 г (3 моль) CDI в 4 мл ацетонитрила выдерживали 1 ч и хроматографировали в градиенте концентрации гексана (50 → 0%) в хлороформе. Выход 1.18 г (90%), $R_{(XXI)}$ 0.42 (Д), т. пл. 101 - 102°C, масс-спектр (FAB), m/z : 639 ($[M + 1]^+$), 527 ($[M - \text{OCOIm}]^+$); ИК-спектр: 1750 (CO), 1700 (C-O), 1380, 1270 (C-O).

Общий метод получения уретанов (XXIII). А. Раствор 0.08 моль флуоресцентного амино-производного (соединения IX, X, XII, XIV, XVII или XX), 127 мг (0.2 моль) имидазолида (XXII) и 3 мг (0.02 моль) DMAP в 0.2 мл пиридина выдерживали 2 ч при 20°C, добавляли 0.5 мл 2% CF_3COOH в хлороформе, через 5 мин упаривали и продукт реакции выделяли с помощью TCX в системе Б или В. Значения R_f соединений (XXIIIa - d) и характеристики молекулярных ионов приведены в таблице.

Б. Раствор 3 мг (0.008 моль) аминопроизводного бензоксазола (XVII), 13 мг (0.02 моль) имидазолида (XXII) и 2 мг (0.02 моль) тетразола в 0.1 мл DMF выдерживали 3 ч при 40°C и детритилировали, как в методе А. При помощи TCX в системе Б выделяли продуктыmono- (XXIIIg) и бис-карбамоилирования (XXIV). Выходы и значения R_f соответственно 48 и 37%; 0.23 и 0.24 (A); 0.85 и 0.78 (B).

Работа финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 94-03-08828).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Краев А.С. // Молекулярн. биология. 1991. Т. 25. № 6. С. 1447 - 1482.
2. Mansfield E.S., Robertson J.M., Lebo R.V., Lucero M.Y., Mayrand P.E., Rappaport E., Parrella T., Sartore M., Surrey S., Fortina P. // Am. J. Med. Genet. 1993. V. 48. № 4. P. 200 - 208.
3. Smith L.M., Kaiser R.J., Sanders J.Z., Hood L.E. // Meth. Enzymol. 1987. V. 155. P. 260 - 301.
4. Lee L.G., Connell C.R., Woo S.L., Cheng R.D., McArdle B.F., Fuller C.W., Halloran N.D., Wilson R.K. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 10. P. 2471 - 2483.
5. Gebeyehu G., Rao P.Y., Soochan P., Simms D.A., Klevan L. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 18. P. 4513.
6. Hovinen J., Azhaeva E., Azhaev A., Guzaev A., Lonberg H. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1994. № 2. P. 211 - 217.
7. Périgaud C., Gosselin G., Imbach J.-L. // Nucleosides & Nucleotides. 1992. V. 11. № 2 - 4. P. 903 - 945.
8. Garcia-Alles L.F., Moris F., Gotor V. // Tetrahedron Lett. 1993. V. 34. № 39. P. 6337 - 6338.
9. Sproat B.S., Brown D.M. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 8. P. 2979 - 2987.
10. Coons A.H., Kaplan M.H. // J. Exp. Med. 1950. V. 91. № 1. P. 1 - 5.
11. Sarmah P., Barua N.C. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 28. P. 4065 - 4066.
12. Yamagishi H., Mitoma Y. // European Patent Application 418 076. 1990. Int. Cl. C07H 21/00.
13. Kumar A., Advani S. // Nucleosides & Nucleotides. 1992. V. 11. № 5. P. 999 - 1002.
14. Kumar A., Malhotra S. // Nucleosides & Nucleotides. 1992. V. 11. № 5. P. 1003 - 1007.
15. Wacher L., Jablonski J.-A., Ramachandran K.L. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 20. P. 7985 - 7994.
16. Pierlot C., Sergheraert C. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1992. V. 2. № 3. P. 267 - 270.
17. Berlin Yu.A., Korshun V.A., Boreskov Yu.G. // Nucl. Acids Symp. Ser. 1991. № 25. P. 85 - 86.
18. Синтезы органических препаратов. М.: ИЛ., 1949. С6. 2. С. 387 - 389.
19. Agrawal S., Tang J.-Y. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 11. P. 1543 - 1546.
20. Lee R.T., Lee Y.C. // Carbohydr. Res. 1974. V. 34. № 1. P. 151 - 160.
21. Korshun V.A., Pestov N.B., Birikh K.R., Berlin Yu.A. // Bioconj. Chem. 1992. V. 3. № 6. P. 559 - 562.

Synthesis of Fluorescent 3'-Carbamoyl Derivatives of Thymidine

Yu. G. Boreskov and Yu. A. Berlin*

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia

Abstract – Synthesis of a number of fluorescent thymidine 3'-urethanes was carried out by coupling of a corresponding 3'-carbonylimidazolide with aminoalkyl derivatives of fluorescein, aminophenylbenzoxazole, or pyrene.

Key words: fluorescent dyes, carbonyl diimidazole, urethanes, nucleosides.

* To whom correspondence should be addressed.