



УДК 577.113.6

## РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ В ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО 2-ФЕНИЛБЕНЗОКСАЗОЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО ДЕЗОКСИУРИДИНА

© 1998 г. Е. В. Малахова, А. Д. Малахов, С. В. Кузницова, О. П. Варнавский\*,  
А. П. Кадуцкий\*\*, Д. Т. Кожич\*\*\*, В. А. Коршун, Ю. А. Берлин<sup>#</sup>

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

\* Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва;

\*\* Институт физико-органической химии НАНБ, Минск;

\*\*\* Медико-биотехнологический институт при концерне "Белбиофарм", Минск

Поступила в редакцию 06.04.98 г. Принята к печати 25.05.98 г.

С помощью реакции Хека–Соногаширы синтезирован новый флуоресцентный нуклеозид 5-[4-(2-бензоксазолил)фенил]этинил-2'-дезоксинуридин и на его основе получены реагенты для мечения олигонуклеотидов – твердофазный носитель и 3'-амидофосфит.

*Ключевые слова:* модифицированные нуклеозиды; 2-фенилбензоксазол.

Возрастающий интерес к химии 5-(алкин-1-ильных) производных пиримидиновых нуклеозидов обусловлен в основном двумя полезными свойствами этих соединений.

Во-первых, алкинсодержащий заместитель в положении 5 оказался превосходным линкером для присоединения флуоресцентных красителей к 5'-трифосфатам ddU и ddC с точки зрения их субстратных свойств в ДНК-полимеразной реакции и использования в автоматизированных системах секвенирования ДНК [2–5].

Во-вторых, поскольку 1-алкин-1-ильные (в частности, пропиные) заместители в этом положении оказывают существенное стабилизирующее влияние на ДНК–ДНК- и ДНК–РНК-дуплексы (см. обзоры [6, 7]), модифицированные таким образом нуклеозиды находят применение в качестве компонентов антисмысловых реагентов (см., например, [8–14]), причем в этом случае введение модифицированных нуклеозидов в олигонуклеотиды осуществляется в стандартных условиях химического синтеза.

Сайт-специфическое введение флуорофоров в синтетические олигонуклеотиды представляет интерес с точки зрения применения таких конъюгатов в качестве инструментов структурных исследований нуклеиновых кислот, в частности, с

использованием резонансного безызлучательно-го переноса энергии (fluorescence resonance energy transfer, FRET) (см. обзоры [15–19], [20] и цитированные там работы). Поэтому весьма перспективным представляется присоединение красителей к нуклеозидам таким образом, чтобы модифицированный нуклеозид мог быть введен в стандартный олигонуклеотидный синтез и чтобы модификация существенно не нарушала специфичности узнавания и прочности связывания конъюгата с комплементарной последовательностью.

В рамках проводимых нами исследований флуоресцентных производных нуклеозидов, в которых флуорофор π-сопряжен с гетероциклическим основанием через тройную связь [1], представляло интерес получение такого 2-фенилбензоксазольного производного. Как сам 2-фенилбензоксазол, так и его производные флуоресцируют в ближней УФ/видимой области и обладают высокими квантовыми выходами флуоресценции [21]. Интересным свойством 2-арилбензоксазолов является также способность к фотохимической димеризации по C=N-связи в соответствующие 1,3-диазетидины [22–24].

В данной работе мы описываем синтез 5-[4-(2-бензоксазолил)фенил]этинил-2'-дезоксинуридина (IX) и реагентов на его основе для твердофазного амидофосфитного олигонуклеотидного синтеза.

Наиболее удобным методом получения 5-(алкин-1-ильных) производных 2'-дезоксинуридина является взаимодействие соответствующего 5-йод-

Предыдущее сообщение см. [1].

Сокращения: DMAP – 4-диметиламинопиридин, DMT – 4,4'-диметокситриптил, LCAA-GPG – аминоклирированное стекло с определенным размером пор.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: yuber@ibch.siohc.ras.ru).

производного нуклеозида с терминальными алкинами в условиях реакции Хека–Соногаширы, предусматривающих использование комплексного палладиево-медного катализатора (см. обзор [25]).

Необходимый 2-(4-этинилфенил)бензоксазол (III) был синтезирован двумя путями (схема 1). Оба метода включают в себя сочетание галогенарена (I) с монозащищенным ацетиленом и последующее деблокирование продукта реакции Хека–Соногаширы с образованием целевого терминального алкина (III).

В первом методе был использован 2-(4-иодфенил)бензоксазол (Ia) и довольно дорогие реагенты – триметилсилацетилен, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> и Bu<sub>4</sub>NF. В этом случае обе стадии гладко протекают при комнатной температуре, промежуточное вещество (II) легко выделяется, и выход соединения (III) высокий.

Во втором методе исходили из броманалога (Iб), который был синтезирован конденсацией 2-аминофенола с 4-бромбензальдегидом с последующей окислительной циклизацией образовавшегося альдимида под действием иодозобензолдиацетата в условиях, аналогичных описанным в

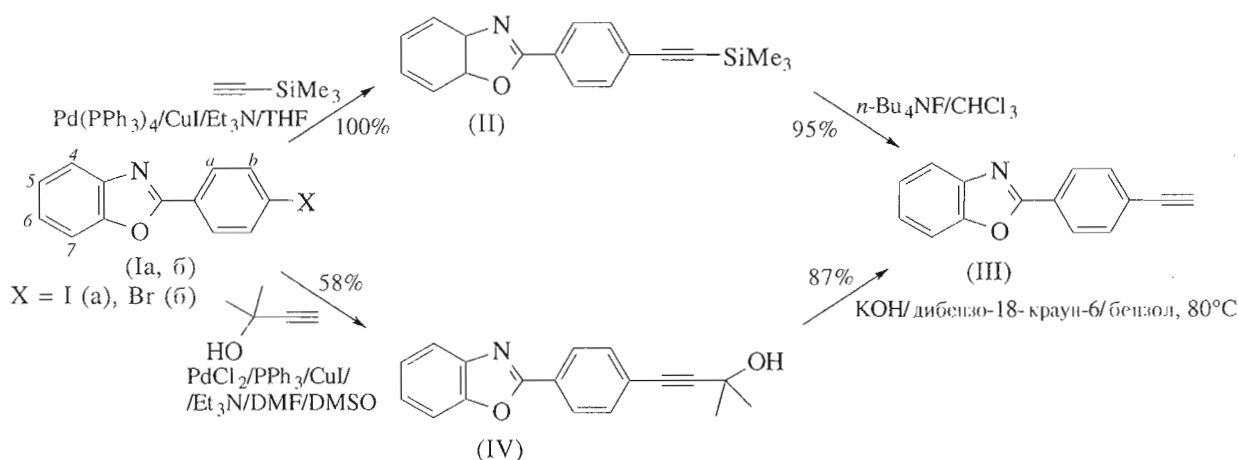


Схема 1.

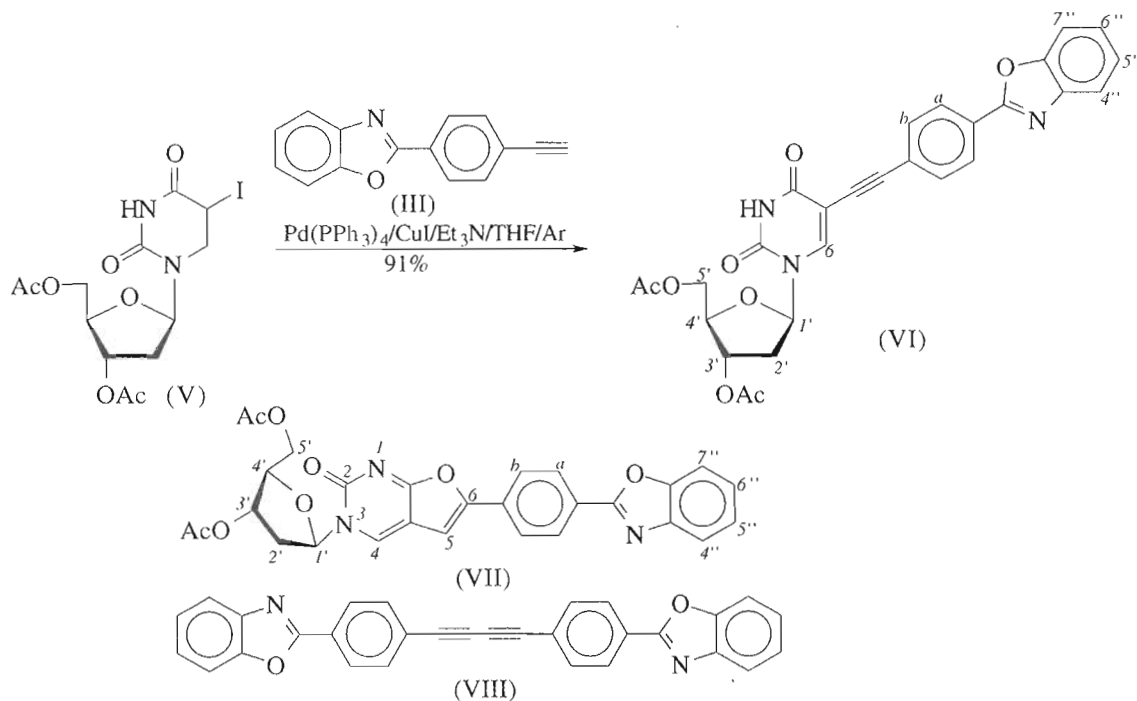


Схема 2.

работе [26]. В этом случае при синтезе этинильного производного интермедиат (IV) нуждается в более трудоемкой очистке, для деблокирования требуется нагревание, и общий выход алкина (III) несколько ниже. Однако существенно меньшая стоимость реагентов делает этот путь более привлекательным для крупномасштабного синтеза.

Алкинилирование нуклеозида проводили взаимодействием 3',5'-ди-*O*-ацетил-5-йод-2'-дезоксисуридина (V) с алкином (III) в тетрагидрофуране в присутствии Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, CuI и триэтиламина (схема 2) при комнатной температуре в течение 12 ч. В результате с высоким выходом был получен нормальный продукт сочетания – 3',5'-ди-*O*-ацетил-5-[4-(2-бензоксазолил)фенил]этинил-2'-дезоксисуридин (VI), причем дальнейшая гетероциклизация целевого вещества практически не происходила – побочный фуropyримидинон (VII) образовывался лишь в следовых количествах.

В реакцию Хека–Соногаширы алкин (IV) вводили в небольшом (20%) избытке, поскольку он даже при тщательном удалении кислорода час-

точно расходовался на образование продукта окислительной димеризации – 1,4-бис[4-(2-бензоксазолил)фенил]бутадиина (VIII), слабо растворимого в большинстве органических растворителей.

Использование диацетильного производного 5-йод-2'-дезоксисуридина в реакции сочетания целесообразно из-за хорошей растворимости продукта реакции (VI), который легко может быть выделен хроматографией на силикагеле. Деацетилирование вещества (VI) водно-диоксановым раствором аммиака дает 5-[4-(2-бензоксазолил)фенил]этинил-2'-дезоксисуридин (IX) с количественным выходом (схема 3). Сочетание 5-йод-2'-дезоксисуридина с алкином (III) в подходящем растворителе (DMF/DMSO) сразу приводит к целевому продукту (IX), но из-за малой растворимости его выделение и очистка от бутадиина (VIII) даже в небольших масштабах затруднительна.

Модифицированный нуклеозид (IX) может быть введен в состав олигонуклеотидов и использован в качестве флуоресцентной метки с потенци-

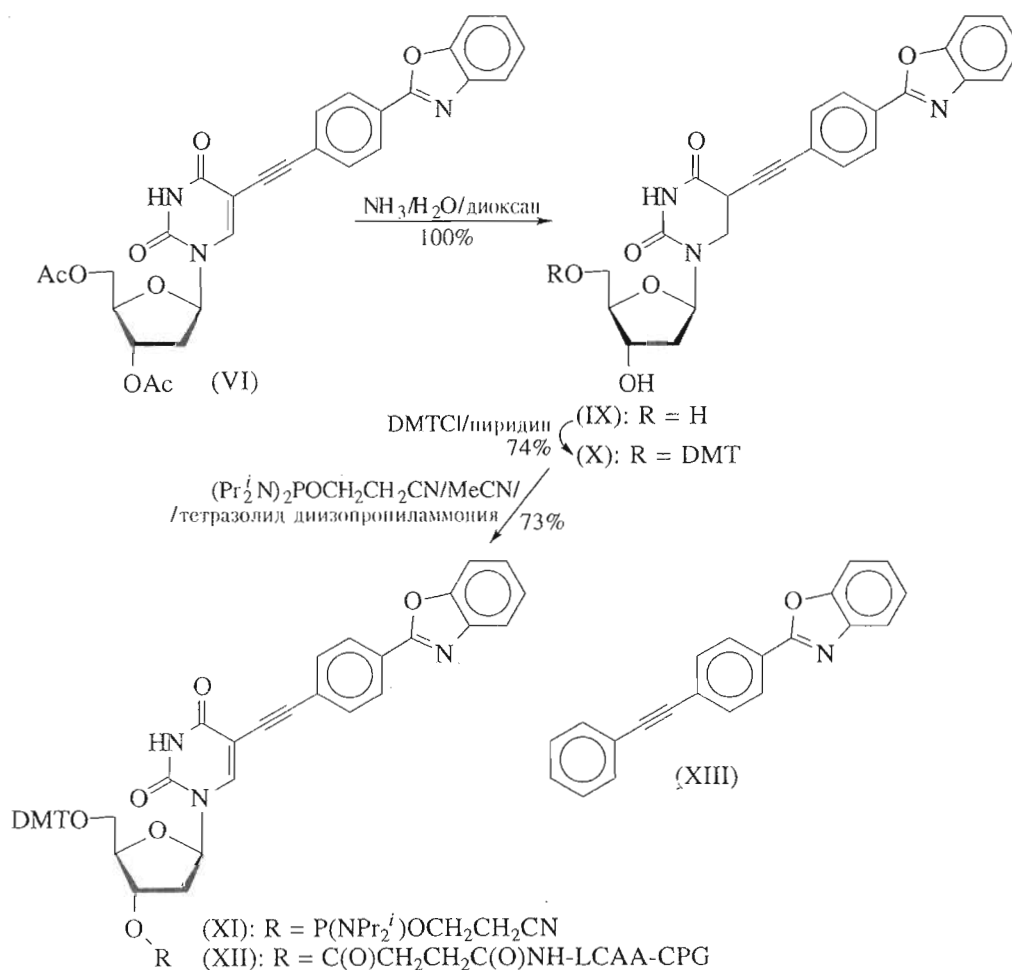


Схема 3.

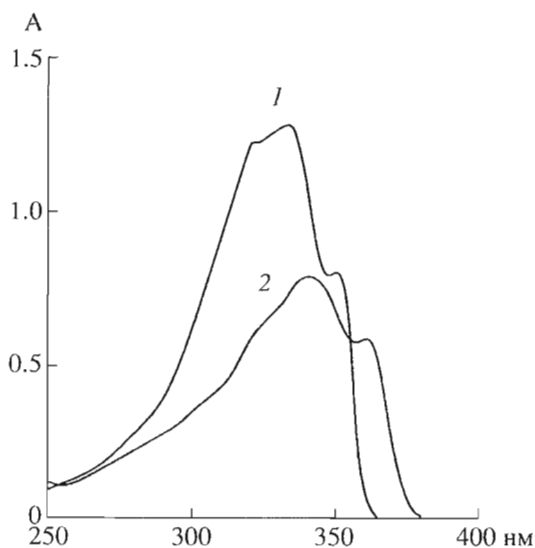


Рис. 1. УФ-спектры 2-[4-(фенилэтинил)фенил]бензоксазола (XIII) (1) и 3',5'-ди-*O*-ацетил-5-[4-(2-бензоксазолил)фенил]этинил-2'-дезоксинуридина (VI) (2) в THF, концентрации  $2 \times 10^{-5}$  М,  $l = 1$  см.

альной зависимостью спектра флуоресценции от микроокружения, в том числе от комплементарного взаимодействия нуклеиновых кислот. На схеме 3 представлены синтезы амидофосфитного реагента (XI) из нуклеозида (IX) по методикам, используемым для обычных нуклеозидов [27], и носителя (XII) по методу [28].

В качестве модельного соединения сочетанием 2-(4-иодфенил)бензоксазола (Ia) с фенилацетиленом синтезирован 2-[(4-фенилэтинил)фенил]бензоксазол (4-(2-бензоксазолил)толан) (XIII), который является аналогом соединений (VI) и (IX)–(XI), содержащим фенильный остаток вместо нуклео-

зидного. При сравнении спектров поглощения веществ (VI) и (XIII) в тетрагидрофане (рис. 1) видно, что при замене фенильного остатка на нуклеозидный общий вид спектра сохраняется, но происходит небольшой (7–10 нм) bathochromный сдвиг и примерно полторакратное уменьшение молярного коэффициента поглощения.

Флуоресцентные свойства 2-фенилбензоксазола в составе нуклеозидов сохраняются. При сравнении эмиссионных спектров защищенного нуклеозида (VI) и модельного 4-(2-бензоксазолил)толана (XIII) в THF (рис. 2) видно, что при одинаковых концентрациях интенсивность эмиссии нуклеозидного производного больше, чем фенильного (при этом молярный коэффициент поглощения ( $\epsilon_{337}$ ) у толана (XIII) в 1.5 раза больше). Спектр флуоресценции нуклеозида (VI) неструктурирован (состоит из одной широкой полосы), однако при 10-кратном разбавлении приобретает выраженную структуру и большее сходство со спектром модельного соединения.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы 2-аминофенол, 1,3-диизопропилкарбодиимид, 4-диметиламинопиридин (DMAP), 2-метил-3-бутин-2-ол,  $\text{Cu}_4\text{NF}$  (Fluka), диметокситритилхлорид, триметилсилилацетилен,  $\text{CuI}$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (Aldrich); остальные реактивы и растворители – отечественного производства квалификации “ч.” и “ч. д. а.”. Тетрагидрофан перегоняли над натрийбензофенонкетимом и хранили над натрием. 3',5'-Ди-*O*-ацетил-5-иод-2'-дезоксинуридин [29] и 2-цианэтоксисибидиизопропиламинофосфин и тетразолил диизопропиламония [27], а также 2-(4-иодфенил)бензоксазол [30] синтезировали, как описано в литературе. За ходом реакций следили с помощью ТСХ. Растворы высушива-

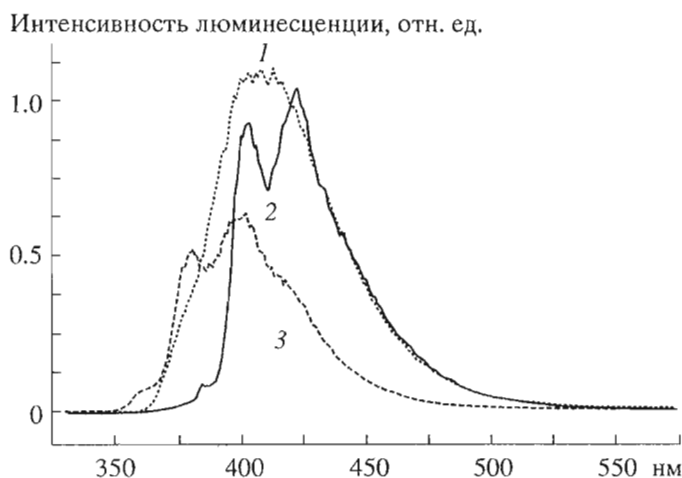


Рис. 2. Эмиссионные спектры 3',5'-ди-*O*-ацетил-5-[4-(2-бензоксазолил)фенил]этинил-2'-дезоксинуридина (VI), концентрации  $2 \times 10^{-5}$  М (1),  $2 \times 10^{-6}$  М (2), и 2-[4-(фенилэтинил)фенил]бензоксазола (XIII), концентрация  $2 \times 10^{-5}$  М (3) в THF.

ли  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривание растворителей проводили на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса при температуре бани 30–50°C.

Температуры плавления определяли на нагревательном столике Voetius (не исправлены). Для ТСХ использовали пластинки Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck); пятна визуализировали в УФ-свете при 256 или 360 нм. Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel 60 (Merck), размер частиц 40–63 мкм, или оксид алюминия (Merck), активность II, размер частиц 40–100 мкм. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР регистрировали на приборе Bruker AC-500 (шкала  $\delta$ , приведены химические сдвиги относительно тетраметилсилана, внутренний стандарт – примесь протонов в дейтерированных растворителях; приведены КССВ в герцах). Спектр <sup>31</sup>P-ЯМР зарегистрирован на приборе Varian XR-400, рабочая частота для <sup>31</sup>P 161.9 МГц, шкала  $\delta$ , химические сдвиги приведены относительно 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Масс-спектры получали на приборе Varian-MAT-44S (ионизация электронным ударом). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu OPC-65. Спектры флуоресценции регистрировали на оптическом многоканальном анализаторе Princeton Applied Research OMA-2 с монохроматором Jobin-Yvon HR-320, для возбуждения использовался азотный лазер ЛГ-21 с длиной волны 337 нм.

**2-(4-Бромфенил)бензоксазол (Iб).** 2-Аминофенол (5.0 г, 46 ммоль) при нагревании растворили в этаноле (30 мл) и к полученному раствору прибавили горячий раствор 4-бромбензальдегида (9.436 г, 51 ммоль) в этаноле (20 мл). Реакционную массу охладили до комнатной температуры и выпавший осадок перекристаллизовали из этанола. Выход основания Шиффа 12.16 г (96%); масс-спектр,  $m/z^+$ : 275, рассчитано 276.14 ( $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrNO}$ ). Выделенный альдимин растворили при нагревании в ацетонитриле (100 мл) и к полученному раствору прибавили иодозобензолдиацетат (21.26 г, 66 ммоль). Реакционную смесь нагрели до кипения и медленно охладили до комнатной температуры, затем упарили досуха и остаток хроматографировали на  $\text{Al}_2\text{O}_3$  в системе бензол–гексан, 7 : 3. Выход соединения (Iб) 12.0 г (100% на основание Шиффа); т. пл. 154°C (гексан) (т. пл. 154–155°C [30]);  $R_f$  0.38 (бензол). Масс-спектр,  $m/z^+$ : 275, 273; рассчитано 274.12 ( $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{BrNO}$ ). <sup>1</sup>H-ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 8.15 (д, 2H, J 8.1, Ha), 7.78 (м, 1H, H-4), 7.69 (д, 2H, J 8.1, Hb), 7.58 (м, 1H, H-7), 7.37 (м, 2H, H-5, H-6).

**2-(4-Триметилсилилэтинилфенил)бензоксазол (II).** К раствору 2-(4-иодфенил)бензоксазола (Ia) (получен аналогично соответствующему бромиду [30]) (0.90 г, 2.8 ммоль) в THF (15 мл) при перемешивании в атмосфере аргона последовательно прибавили триметилсилилацетилен (0.5 мл, 3.54 ммоль),  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.80 мл, 5.74 ммоль),  $\text{CuI}$  (53 мг, 0.28 ммоль) и  $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$  (162 мг, 0.14 ммоль) и про-

должали перемешивание при комнатной температуре в течение 12 ч. Затем реакционную смесь разбавили хлороформом (150 мл) и последовательно промыли водой (100 мл), 1% раствором лимонной кислоты (100 мл), 3% раствором EDTA-( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub> (2 × 100 мл) и снова водой (100 мл). Органический слой высушили, растворитель упарили и остаток хроматографировали на силикагеле в системе гексан–бензол, 3 : 2. Выход 0.817 г (100%); т. пл. 156–157°C (гексан);  $R_f$  0.36 (бензол). Масс-спектр,  $m/z^+$ : 290; рассчитано 291.42 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NOSi}$ ). <sup>1</sup>H-ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 8.21 (д, 2H, J 8.2, Ha), 7.78 (м, 1H, H-4), 7.63 (д, 2H, J 8.2, Hb), 7.58 (м, 1H, H-7), 7.37 (м, 2H, H-5, H-6), 0.32 (с, 9H,  $\text{CH}_3$ ).

**2-[4-(3-Гидрокси-3-метил-1-бутинил-1)фенил]бензоксазол (IV).** К раствору 2-(4-бромфенил)бензоксазола (Iб) (12.0 г, 44 ммоль) в смеси DMF (150 мл) и DMSO (10 мл) в атмосфере аргона прибавили 2-метил-3-бутин-2-ол (13.0 мл, 132 ммоль),  $\text{Et}_3\text{N}$  (12.3 мл, 88 ммоль),  $\text{CuI}$  (419 мг, 2.2 ммоль),  $\text{PdCl}_2$  (612 мг, 2.2 ммоль) и трифенилфосфин (1.731 г, 6.6 ммоль). Реакционную смесь оставили при комнатной температуре на 12 ч, разбавили  $\text{EtOAc}$  (300 мл) и последовательно промыли водой (5 × 200 мл), 3% раствором диаммониевой соли EDTA (3 × 200 мл) и снова водой (200 мл). Органическую фазу высушили, упарили и целевой продукт выделили хроматографией на силикагеле (элюирование градиентом  $\text{EtOAc}$  (0 → 10%) в бензоле). После перекристаллизации из смеси бензол–гексан выход соединения (IV) составил 7.051 г (58%); т. пл. 144–145°C (бензол);  $R_f$  0.50 (бензол– $\text{EtOAc}$ , 4 : 1). Масс-спектр,  $m/z^+$ : 275, рассчитано 277.33 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ ). <sup>1</sup>H-ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 8.21 (д, 2H, J 8.5, Ha), 7.79 (м, 1H, H-4), 7.59 (м, 1H, H-7), 7.56 (д, 2H, J 8.5, Hb), 7.37 (м, 2H, H-5, H-6), 1.65 (с, 6H,  $\text{CH}_3$ ).

**2-(4-Этинилфенил)бензоксазол (III).** А. К раствору 2-[4-(3-гидрокси-3-метил-1-бутинил-1)фенил]бензоксазола (IV) (3.55 г, 13 ммоль) в бензоле (200 мл) прибавили дибензо-18-краун-6 (1.37 г, 3.8 ммоль) и реакционную смесь нагревали до полного растворения осадка. К полученному раствору прибавили растертый в порошок гидроксид калия (2.157 г, 0.038 моль) и реакционную смесь оставили при комнатной температуре на 12 ч. Затем осадок отфильтровали, фильтрат промыли водой (3 × 100 мл), органический слой высушили и упарили, и остаток хроматографировали на силикагеле в бензоле. Выход этинилфенилбензоксазола (III) 2.48 г (87%); т. пл. 163–165°C (гексан);  $R_f$  0.35 (бензол). Масс-спектр,  $m/z^+$ : 219, 218, рассчитано 219.24 ( $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{NO}$ ). <sup>1</sup>H-ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ): 8.23 (д, 2H, J 8.7, Ha), 7.79 (м, 1H, H-4), 7.65 (д, 2H, J 8.7, Hb), 7.59 (м, 1H, H-7), 7.38 (м, 2H, H-5, H-6), 3.24 (с, 1H,  $\text{C}\equiv\text{CH}$ ).

Б. К раствору 2-(4-триметилсилилэтинил)фенилбензоксазола (II) (0.805 г, 2.76 ммоль) в хлороформе (15 мл) прибавили тригидрат тетрабутил-

аммонийфторида (0.938 г, 2.973 ммоль) и смесь оставили на 1 ч при комнатной температуре. Затем реакционную массу разбавили хлороформом (300 мл) и последовательно промыли водой (200 мл), 1% водным раствором лимонной кислоты (100 мл) и снова водой (200 мл). Органический слой высушили и упарили, и остаток хроматографировали на силикагеле в бензоле. Выход соединения (III) 0.577 г (95%).

**3',5'-Ди-*O*-ацетил-5-[4-(2-бензоксазолил)фенил]этинил-2'-дезоксуридин (VI).** К раствору 3',5'-ди-*O*-ацетил-5-иод-2'-дезоксуридина (V) (0.749 г, 1.71 ммоль) в THF (15 мл) в атмосфере аргона прибавили 2-(4-этинилфенил)бензоксазол (III) (0.450 г, 2.052 ммоль), Et<sub>3</sub>N (0.5 мл, 3.59 ммоль), CuI (0.033 г, 0.17 ммоль) и Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (0.149 г, 0.129 ммоль) и реакционную смесь оставили на 12 ч при комнатной температуре. Затем отфильтровали димер (VIII) (135 мг), фильтрат упарили, остаток растворили в этилацетате (150 мл) и последовательно промыли водой (100 мл), 1% раствором лимонной кислоты (100 мл), 3% раствором диаммониевой соли EDTA (3 × 100 мл) и водой (100 мл). Органический слой высушили и упарили, и остаток хроматографировали на силикагеле (элюировали градиентом метанола (0 → 5%) в смеси бензол-этилацетат, 85 : 15). Выход соединения (VI) 0.822 г (91%). *R<sub>f</sub>* 0.19 (5% MeOH в бензоле). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 8.70 (уш. с, 1H, NH), 8.23 (д, 2H, *J* 8.6, Ha), 7.93 (с, 1H, H-6), 7.78 (м, 1H, H-4"), 7.63 (д, 2H, *J* 8.6, Hb), 7.59 (м, 1H, H-7"), 7.37 (м, 2H, H-5", H-6"), 6.33 (дд, 1H, *J*<sub>1,2α</sub> 5.9, *J*<sub>1,2β</sub> 7.5, H-1'), 5.28 (м, 1H, H-3'), 4.42 (д, 2H, *J*<sub>4,5'</sub> 3.2, H-5'), 4.33 (м, 1H, H-4'), 2.60 (ддд, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>2α,2β</sub> 14.1, *J*<sub>1,2α</sub> 5.9, *J*<sub>2α,3'</sub> 2.3, H-2'α), 2.30 (м, 1H, H-2'β), 2.20 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.13 (с, 3H, CH<sub>3</sub>).

В качестве побочного продукта был выделен (см. выше) **1,4-бис[4-(2-бензоксазолил)фенил]бутадин-1,3 (VIII)**, т. пл. 168–170°C (толуол), *R<sub>f</sub>* 0.62 (EtOAc-бензол, 1 : 1). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 8.27 (д, 4H, *J* 8.3, Ha), 7.80 (м, 2H, H-4), 7.70 (д, 4H, *J* 8.3, Hb), 7.60 (м, 2H, H-7), 7.39 (м, 4H, H-5, H-6).

Был также выделен продукт циклизации **3-(3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-дезоксид-β-*D*-рибофуранозил)-6-[4-(2-бензоксазолил)фенил]фуро[2,3-*d*]пиримидин-2-он (VII)**; *R<sub>f</sub>* 0.24 (2% MeOH в CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>): 8.39 (с, 1H, H-4), 8.34 (д, 2H, *J* 8.4, Ha), 7.92 (д, 2H, *J* 8.4, Hb), 7.80 (м, 1H, H-4"), 7.60 (м, 1H, H-7"), 7.38 (м, 2H, H-5", H-6"), 6.88 (с, 1H, H-5), 6.35 (кажущийся т, 1H, *J*<sub>1,2α</sub> = *J*<sub>1,2β</sub> 6.6, H-1'), 5.26 (м, 1H, H-3'), 4.44 (м, 3H, H-4', H-5'), 3.02 (м, 1H, H-2'α), 2.17 (м, 1H, H-2'β), 2.14 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.09 (с, 3H, CH<sub>3</sub>).

**5-[4-(2-Бензоксазолил)фенилэтинил]-2'-дезоксуридин (IX).** К раствору диацетата (VI) (1.0 г, 2 ммоль) в диоксане (40 мл) прибавили 25% водный раствор аммиака (20 мл), смесь выдержали при комнатной температуре 14 ч и упарили. Оста-

ток упарили с этанолом (3 × 100 мл) и перекристаллизовали из смеси диоксан-вода. Выход продукта аммонолиза (IX) 0.891 г (100%); *R<sub>f</sub>* 0.28 (10% MeOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 8.48 (с, 1H, H-6), 8.23 (д, 2H, *J* 8.2, Ha), 8.23 (м, 2H, H-4", H-7"), 7.71 (д, 2H, *J* 8.2, Hb), 7.46 (м, 2H, H-5", H-6"), 6.14 (кажущийся т, 1H, *J*<sub>1,2α</sub> = *J*<sub>1,2β</sub> 6.4, H-1'), 5.40 (д, 1H, *J* 4.0, 3'-OH), 5.29 (т, 1H, *J* 4.7, 5'-OH), 4.29 (м, 1H, H-3'), 3.85 (м, 1H, H-4'), 3.63 (м, 2H, H-5'), 2.19 (м, 2H, H-2').

**5'-*O*-(4,4'-Диметокситритил)-5-[4-(2-бензоксазолил)фенил]этинил-2'-дезоксуридин (X).** 5-[4-(2-бензоксазолил)фенил]этинил-2'-дезоксуридин (IX) (890 мг, 2 ммоль) дважды упарили с пиридином (2 × 30 мл), растворили в 80 мл пиридина и раствор упарили на одну треть. Затем при перемешивании прибавили 4,4'-диметокситритилхлорид (0.946 г, 2.79 ммоль), реакционную смесь выдержали 12 ч при комнатной температуре и упарили. Маслообразный остаток разбавили этилацетатом (150 мл) и последовательно промыли насыщенными растворами NaHCO<sub>3</sub> (2 × 100 мл) и NaCl (2 × 100 мл). Органический слой высушили и упарили, а остаток хроматографировали на силикагеле (элюент бензол-этилацетат (10 : 1) + 0.1% Et<sub>3</sub>N). Выход 1.117 г (74%); т. пл. 110–112°C (EtOAc); *R<sub>f</sub>* 0.54 (20% MeOH в бензоле + 0.1% Et<sub>3</sub>N).

**5'-*O*-(4,4'-Диметокситритил)-3'-*O*-(диизопропиламино-2-цианэтоксифосфинил)-5-[4-(2-бензоксазолил)фенил]этинил-2'-дезоксуридин (XI).** 5'-*O*-(4,4'-Диметокситритил)-5-[4-(2-бензоксазолил)фенил]этинил-2'-дезоксуридин (X) (0.50 г, 0.669 ммоль) дважды упарили с безводным ацетонитрилом (2 × 30 мл) и остаток растворили в безводном ацетонитриле (80 мл). К полученному раствору при перемешивании прибавили 2-цианэтоксидибисдиизопропил диизопропиламмония (0.72 мл, 2.27 ммоль) и тетразолид диизопропиламмония (0.207 г, 1.20 ммоль). Реакционную смесь упарили на одну треть, выдержали 12 ч при комнатной температуре, разбавили этилацетатом (150 мл) и последовательно промыли насыщенными растворами NaHCO<sub>3</sub> (3 × 100 мл) и NaCl (2 × 100 мл). Органический слой высушили и упарили, а остаток хроматографировали на силикагеле в смеси бензол-этилацетат (0 → 100% EtOAc) + 3% Et<sub>3</sub>N. Выход амидофосфита (XI) 465 мг (73%). *R<sub>f1</sub>* 0.74, *R<sub>f2</sub>* 0.63 (диастереомеры). <sup>31</sup>P-ЯМР (CD<sub>3</sub>CN): 151.896, 151.832 (диастереомеры, ~2 : 1).

**Модифицированный носитель (XII).** Носитель 500 Å LCAA-CPG (300 мг), ацилированный янтарным ангидридом по методу [28], суспендировали в смеси DMF-пиридин (1 : 1; 4 мл), содержащей монотритилированный нуклеозид (X) (187 мг, 0.25 ммоль), 1,3-диизопропилкарбодиимид (280 мкл, 1.8 ммоль) и DMAP (20 мг), и выдержали 48 ч при комнатной температуре. Затем прибавили раствор пентафторфенола (100 мг) в пи-



ридине (1 мл), смесь выдержали еще 12 ч, носитель отфильтровали, суспендировали в 5% растворе пирролидина в пиридине (3 мл), выдержали 10 мин, носитель отфильтровали и последовательно промыли хлороформом, метанолом, ацетонитрилом и эфиром (по 10 мл). Загрузка носителя по нуклеозиду, определенная по поглощению диметокситритильного катиона [31], составила 43.7 мкмоль/г.

**2-[4-(Фенилэтинил)фенил]бензоксазол (4-(2-бензоксазоллил)толан) (XIII).** К перемешиваемому в атмосфере аргона раствору 1.00 г (3.11 ммоль) 2-(4-иодфенил)бензоксазола (Ia) в 25 мл THF последовательно прибавили фенилацетилен (0.41 мл, 3.74 ммоль), Et<sub>3</sub>N (0.9 мл, 6.46 ммоль), CuI (59 мг, 0.31 ммоль), Ph<sub>3</sub>P (82 мг, 0.31 ммоль) и PdCl<sub>2</sub> (43 мг, 0.16 ммоль) и продолжали перемешивать 30 мин при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавили 200 мл хлороформа и последовательно промыли 100 мл порциями воды, 1% раствора лимонной кислоты, 3% раствора диаммониевой соли EDTA (трижды) и снова воды. Органическую фазу высушили, упарили и остаток хроматографировали на силикагеле в градиенте концентрации бензола (25 → 55%) в петролейном эфире. После упаривания объединенных фракций остаток перекристаллизовали из смеси петролейный эфир–толуол 5 : 1. Выход соединения (XIII) 0.564 г (61%), т. пл. 192–193°C; R<sub>f</sub> 0.22 (бензол). Масс-спектр, m/z<sup>+</sup>: 294; рассчитано 295.34 (C<sub>21</sub>H<sub>13</sub>NO).

Авторы выражают благодарность Ю.П. Козмину (ИБХ РАН) за регистрацию масс-спектров, Э.И. Лажко (НИИНА) за регистрацию <sup>31</sup>P-ЯМР-спектра, Д.С. Стеценко (ИБХ РАН) за обсуждение и Г.В. Малееву (ВКНЦ) за помощь в проведении некоторых экспериментов. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры получены на установке “Комплекс ЯМР-спектрометрии” при финансовой поддержке Миннауки России (регистрационный номер 96-03-08).

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 97-03-32927а.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коршун В.А., Манасова Е.В., Балакин К.В., Прохоренко И.А., Бучацкий А.Г., Берлин Ю.А. // Био-орган. химия. 1996. Т. 22. С. 923–925.
2. Prober J.M., Trainor G.L., Dam R.J., Hobbs F.W., Robertson C.W., Zagursky R.J., Cocuzza A.J., Jensen M.A., Baumeister K. // Science. 1987. V. 238. P. 336–341.
3. Confalone P.N. // J. Heterocycl. Chem. 1990. V. 27. P. 31–46.
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. P. 2471–2483.
5. Rosenblum B.B., Lee L.G., Spurgeon S.L., Khan S.H., Menchen S.M., Heiner C.R., Chen S.M. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 4500–4504.
6. De Mesmaeker A., Häner R., Martin P., Moser H.E. // Acc. Chem. Res. 1995. V. 28. P. 366–374.
7. Freier S.M., Altmann K.-H. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 4429–4443.
8. Wagner R.W., Matteucci M.D., Lewis J.G., Gutierrez A.J., Moulds C., Froehler B.C. // Science. 1993. V. 260. P. 1510–1513.
9. Fenster S.D., Wagner R.W., Froehler B.C., Chin D.J. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 8391–8398.
10. Moulds C., Lewis J.G., Froehler B.C., Grant D., Huang T., Milligan J.F., Matteucci M.D., Wagner R.W. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 5044–5053.
11. Wagner R.W., Matteucci M.D., Grant D., Huang T., Froehler B.C. // Nature Biotechnol. 1996. V. 14. P. 840–844.
12. Flanagan W.M., Su L.L., Wagner R.W. // Nature Biotechnol. 1996. V. 14. P. 1139–1145.
13. Flanagan W.M., Kothavale A., Wagner R.W. // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 2936–2941.
14. Gutierrez A.J., Matteucci M.D., Grant D., Matsumura S., Wagner R.W., Froehler B.C. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 743–748.
15. Clegg R.M. // Meth. Enzymol. 1992. V. 211. P. 353–388.
16. Wu P., Brand L. // Anal. Biochem. 1994. V. 218. P. 1–13.
17. Selvin P.R. // Meth. Enzymol. 1995. V. 246. P. 300–334.
18. Clegg R.M. // Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy / Eds X.F. Wang, B. Herman. New York: Wiley, 1996. P. 179–252.
19. Glazer A.N., Mathies R.A. // Curr. Opin. Biotechnol. 1997. V. 8. P. 94–102.
20. Ota N., Hirano K., Warashina M., Andrus A., Mullah B., Hatanaka K., Taira K. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 735–743.
21. Reiser A., Leyshon L.J., Saunders D., Mijovic M.V., Bright A., Bobie J. // J. Am. Chem. Soc. 1972. V. 94. P. 2414–2421.
22. Roussilhe J., Despax B., Lopez A., Paillous N. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1982. P. 380–381.
23. Roussilhe J., Fargin E., Lopez A., Despax B., Paillous N. // J. Org. Chem. 1983. V. 48. P. 3736–3741.
24. Fery-Forgues S., Paillous N. // J. Org. Chem. 1986. V. 51. P. 672–677.
25. Коршун В.А., Манасова Е.В., Берлин Ю.А. // Био-орган. химия. 1997. Т. 23. С. 324–386.
26. Varma R.S., Saini R.K., Prakash O. // Tetrahedron Lett. 1997. V. 38. P. 2621–2622.
27. Caruthers M.H., Barone A.D., Beaucauge S.L., Dodds D.R., Fisher E.F., McBride L.J., Matteucci M., Stabinsky Z., Tang J.-Y. // Meth. Enzymol. 1987. V. 154. P. 287–313.
28. Damha M.J., Giannaris P.A., Zabarylo S.V. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 3813–3821.
29. Robins M.J., Barr P.J. // J. Org. Chem. 1983. V. 48. P. 1854–1862.
30. So Y.-H., Zaleski J.M., Murlick C., Ellaboudy A. // Macromolecules. 1996. V. 29. P. 2783–2795.
31. Atkinson T., Smith M. // Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach // Ed. M.H. Gait. IRL Press: Oxford, 1984. P. 36–81.

## Reagents for Introducing a Fluorescent Deoxyuridine 2-Phenylbenzoxazole Derivative into Oligonucleotides

**E. V. Malakhova\***, **A. D. Malakhov\***, **S. V. Kuznitsova\***, **O. P. Varnavskii\*\***,  
**A. P. Kadutskii\*\*\***, **D. T. Kozhich\*\*\*\***, **V. A. Korshun\***, and **Yu. A. Berlin\*<sup>#</sup>**

\**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

\*\**Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

\*\*\**Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

\*\*\*\**Medico-biotechnological Institute, Belbiopharm, Minsk, Belarus*

Using the Heck–Sonogashira reaction, a new fluorescent nucleoside, 5-[4-(2-benzoxazolyl)phenyl]ethynyl-2'-deoxyuridine, was synthesized and converted into oligonucleotide-labeling reagents, namely, the 3'-phosphoramidite and a functionalized solid support.

*Key words: modified nucleosides, 2-phenylbenzoxazole*

---

<sup>#</sup> *To whom correspondence should be addressed; e-mail: yuber@ibch.siohc.ras.ru.*