



УДК 577.113.4+547.(435+546)

МОНОМЕРЫ ДЛЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО СИНТЕЗА С ЛИНКЕРАМИ, НЕСУЩИМИ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ОСТАТКИ II. СИНТЕЗ ФОСФИТАМИДОВ НА ОСНОВЕ УРИДИНА И ЦИТИДИНА, СОДЕРЖАЩИХ В 2'-ПОЛОЖЕНИИ ЛИНКЕР С МЕТОКСИОКСАЛИЛАМИДНЫМИ ГРУППАМИ

© 2004 г. С. В. Васильева[#], Т. В. Абрамова, Т. М. Иванова,
Г. В. Шишкин, В. Н. Сильников

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 20.12.2002 г. Принята к печати 03.03.2003 г.

Разработан удобный препаративный метод синтеза 2'-амино-2'-дезоксинуридина. Исходя из 2'-амино-2'-дезоксинуридина и 2'-амино-2'-дезоксипиримидина синтезированы мономеры для фосфитамидного олигонуклеотидного синтеза, несущие в 2'-положении линкер с метоксиоксалиламидными группами.

Ключевые слова: 2'-амино-2'-дезоксинуклеозиды; модифицированные нуклеозиды; метоксиоксалиламидные группы.

ВВЕДЕНИЕ

Модифицированные олигонуклеотиды, содержащие активированные группы, находят широкое применение для решения множества задач молекулярной биологии и биоорганической химии, а также в терапевтических и диагностических целях. Определенный интерес представляют олигонуклеотиды, модифицированные по углеводному фрагменту [2, 3]. В литературе подчеркивается уникальная роль заместителя при 2'-С-атоме углеводного фрагмента нуклеиновых кислот. Его природа непосредственно влияет на конформацию сахарофосфатного остова и это препятствует нуклеазному гидролизу [4, 5]. Ранее было показано, что использование ДНК-зондов, содержащих 2'-модифицированные пиримидиновые нуклеозиды, позволяет проводить региоспецифическое гибридазное расщепление РНК РНКазой H [6–10]. Нуклеозиды, содержащие в рибозном кольце аминогруппу, являются эффективными антибактериальными и противораковыми препаратами, а также выступают в качестве синтетических ингибиторов ряда ферментов [11–14]. В то же время наличие аминогруппы в 2'-положении позволяет легко проводить функционализацию нуклеотидного звена. В частности, аминогруппы в этом положении могут быть модифицированы флуорес-

цеинизотиоцианатом (FITC), ангидридами карбоновых и дикарбоновых кислот [15].

Нуклеозиды с аминогруппой в рибозном кольце – удобные синтоны для получения фосфитамидов, содержащих активированные группы. С помощью таких мономеров можно создавать серии олигонуклеотидных конъюгатов на основе одного соединения-предшественника аналогично подходу, реализованному в работе [16]. В литературе описан синтез олигонуклеотидных конъюгатов на основе мономеров, содержащих реакционноспособные метоксиоксалиламидные группы в 5'-положении тимидина [17]. Фосфитамиды 2'-модифицированных нуклеозидов позволяют синтезировать серии олигонуклеотидов, содержащих модифицированные звенья как по концам, так и внутри олигомерной цепи.

Целью данной работы является синтез мономеров для фосфитамидного олигонуклеотидного синтеза, содержащих в 2'-положении реакционноспособные метоксиоксалиламидные группы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве исходного соединения для введения метоксиоксалиламидных групп в 2'-положение пиримидиновых нуклеозидов был выбран 2'-амино-2'-дезоксинуридин. В литературе описано несколько вариантов крупномасштабного лабораторного синтеза этого соединения, однако плохая воспроизводимость [18, 19] и использование в

Сообщение I см. [1].

[#]Автор для переписки (тел.: (3832) 33-37-62, эл. почта: vasilieva_2001@ngs.ru).

синтезе труднодоступных соединений [20] побудили нас к поискам более простого и экономичного метода. В связи с этим был усовершенствован метод синтеза, описанный в работе [21] (схема 1). Из уридина (I) с высоким выходом был получен 2,2'-*O*-ангидро-1-(β-*D*-арабинофуранозил)урацил (II) по методике, предложенной в работе [18]. Взаимодействие соединения (II) с азидом натрия в присутствии дибензо-18-крауна-6 в диметилацетамиде привело к 2'-азидо-2'-дезоксидуридину (III) с выходом 78% (по данным ВЭЖХ). Несмотря на высокое содержание нуклеозида (III) в реакционной смеси, нам не удалось подобрать условий выделения целевого соединения без привлечения хроматографического разделения. Можно отметить, что увеличение количества краун-эфира не

приводит к повышению выхода целевого продукта. Оптимальная температура для проведения реакции – 130–135°C. Увеличение температуры до 140°C и выше приводит к значительному осмолению реакционной смеси и уменьшению выхода. В то же время снижение температуры до 125°C вызывает резкое падение скорости реакции.

Введение диметокситритильной защиты 5'-гидроксильной группы на этой стадии кажется, на первый взгляд, весьма привлекательным. Однако это приводит к образованию сложных реакционных смесей, требующих хроматографического разделения. Более продуктивным оказался другой путь, с временной защитой 2'-аминогруппы. Неочищенный нуклеозид (III) восстанавливали каталитическим гидрированием, образующийся

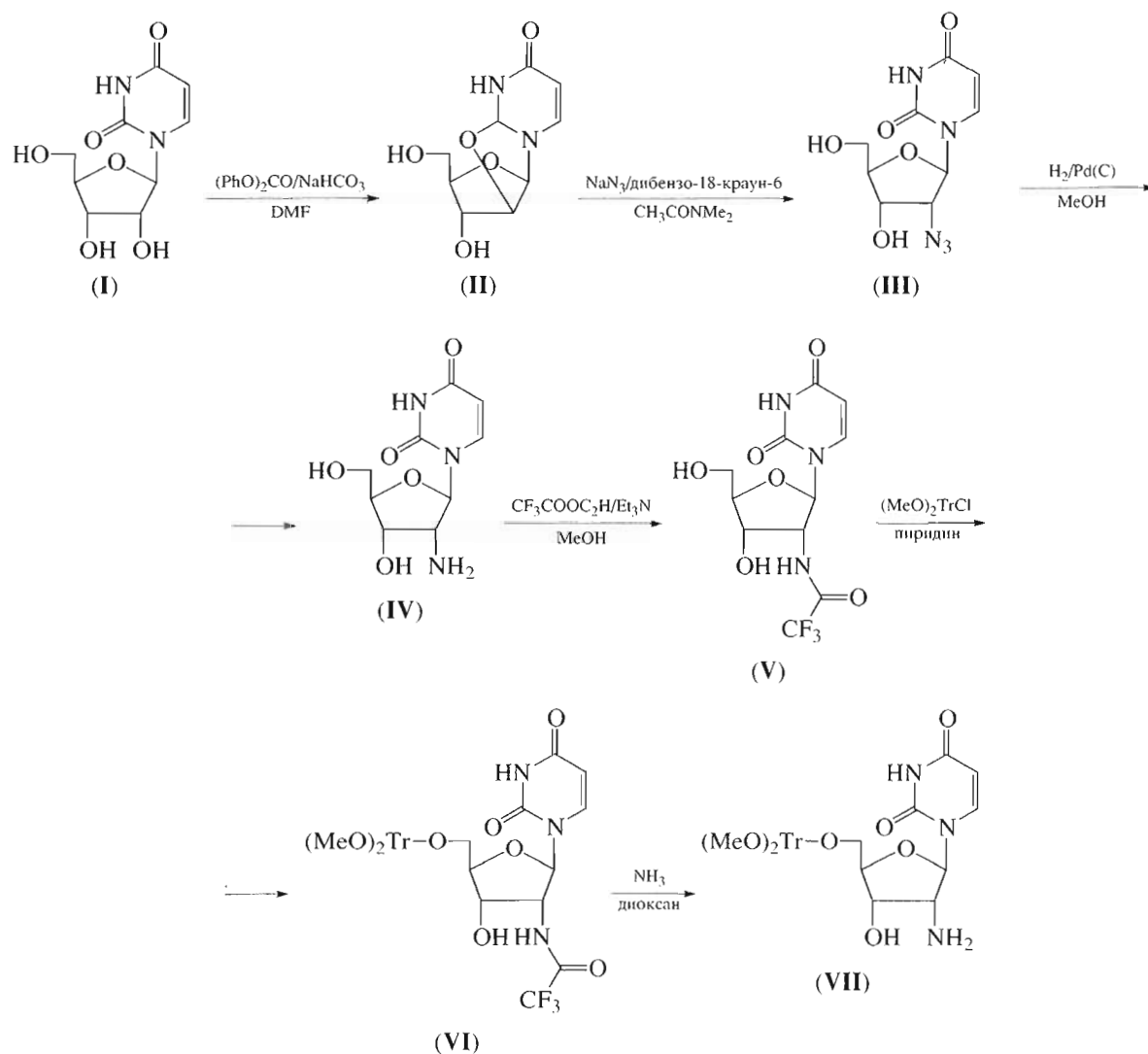


Схема 1. Синтез 2'-амино-5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксидуридина.

2'-амино-2'-дезоксисуридин (IV) очищали на колонке с ионообменной смолой КРС-2п, затем, защитив 2'-аминогруппу трифторацетильной защитой, тритилировали нуклеозид (V) по 5'-гидроксильной группе. После снятия трифторацетильной защиты был получен целевой 2'-амино-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксисуридин (VII). Предложенный путь синтеза позволяет получить нуклеозид (VII) с выходом 25% (в расчете на уридин) без применения хроматографических разделений реакционных смесей на силикагеле.

В литературе есть краткие сведения о синтезе 5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-метоксиоксалиламидо-2'-дезоксисуридина (VIII) [22]. В настоящей работе мы приводим модифицированную методику синтеза этого соединения, которое было получено аналогично [23] реакцией нуклеозида (VII) с диметилоксалатом (схема 2). Фосфитилирование соединения (VIII) по стандартной методике [1] привело к фосфамидиту (IX).

2'-[N,N-Ди(2-метоксиоксалиламидоэтил)аминоэтил]амидооксалиламидо-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксисуридин (XI) может быть получен из нуклеозида (VII) последовательным наращиванием линкерной цепи (схема 2, путь А) либо обработкой предварительно синтезированным трис(карбометоксикарбамоилэтил)амином [1] (схема 2, путь Б). Последний путь выглядит предпочтительным в связи с меньшим числом стадий синтеза. Однако выход этой реакции в различных условиях очень низкий. В то же время последовательные реакции нуклеозида (VII) с диметилоксалатом, трис(2-аминоэтил)амином и снова диметилоксалатом без выделения промежуточного соединения (X) позволили получить нуклеозид (XI) с хорошим выходом. Следует отметить, что введение последующих метилоксалатных групп идет очень легко по сравнению с первой, возможно, из-за уменьшения стерических затруднений. Фосфитилирование соединения (XI) по стандартной методике приводит к фосфамидиту (XII).

Попытка получить 2'-амино-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксидитидин (XVIII) по методике, аналогичной использованной для получения нуклеозида (IV) (исходя из N⁴-бензоил-5'-O-(4,4'-диметокситритил)цитидина [9]), не привела к желаемому результату. В то же время уридин может быть легко превращен в цитидин [18, 19, 24]. Для получения соединения (XVIII) мы исходили из 2'-азидо-2'-дезоксисуридина (III) (схема 3). Переход от уридина к цитидину был осуществлен через триазолидное производное (XV) как описано в работе [19]. Исходный нуклеозид (III) тритилировали с образованием 2'-азидо-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксисуридина (XIII), затем реакцией с триметилхлорсиланом получали 2'-азидо-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-3'-O-триметилсилан-2'-дезоксисуридин (XIV). Его превращали в триазолид-

ное производное (XV) обработкой смесью POCl₃ и 1,2,4-триазола. Последующая обработка соединения (XV) аммиаком дает 2'-азидо-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксидитидин (XVI). Азидогруппу в этом соединении восстанавливали каталитическим гидрированием. Последующая реакция диметилоксалата по аминогруппе полученного нуклеозида (XVII) идет значительно быстрее и в более мягких условиях, чем аналогичная реакция с 2'-амино-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксисуридином (VII). При этом экзоциклическая аминогруппа основания не затрагивается. Последующая защита этой аминогруппы с помощью бензойного ангидрида [25] с хорошим выходом приводит к образованию соединения (XIX). Фосфитилирование этого нуклеозида по стандартной методике дает мономер (XX).

Таким образом, нами получены мономеры (IX), (XII), (XX) для фосфитамидного олигонуклеотидного синтеза, содержащие в 2'-положении реакционноспособные метоксиоксалиламидные группы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы уридин, дифенилкарбонат, диметилоксалат, 2-цианоэтил-N,N,N',N'-тетраизопропиламинофосфит, трис(2-аминоэтил)амин, палладий на активированном угле (Aldrich, США), триметилсиланхлорид (Fluka, Швейцария), 4,4'-диметокситритилхлорид, 1,2,4-триазол (Chem-IMPREG, США), хлорокись фосфора (Merck, Германия), азид натрия (Serva, Германия). Растворители и остальные химические реактивы – отечественного производства квалификаций “х. ч.”, “ч. д. а.” или “ос. ч.”, очищенные при необходимости по стандартным методикам [26]. Препаративную ВЭЖХ проводили на хроматографе “Милихром 4” на колонке 2 × 50 мм с носителем Lichrosorb RP-18, 10 мкм (Merck), элюент – градиент 0 → 40% ацетонитрила в воде, скорость элюции 100 мкл/мин. Для колоночной хроматографии использовали силикагель Porasil Silica 125A (55–105 мкм, Millipore, США). Элюировали градиентом метанола 0 → 20% в хлороформе. Для ТСХ применяли пластинки Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) и следующие системы растворителей: дихлорметан–метанол, 9 : 1 (А); дихлорметан–метанол–триэтиламин, 9 : 1 : 0.1 (Б); этилацетат–метанол, 4 : 1 (В); дихлорметан–метанол–триэтиламин, 9 : 0.8 : 0.1 (Г); дихлорметан–метанол–триэтиламин, 8.7 : 1.2 : 0.1 (Д); дихлорметан–метанол–триэтиламин, 8 : 2 : 0.1 (Е), *трет*-бутиловый спирт–метилэтилкетон–муравьиная кислота–вода, 8 : 6 : 3 : 3 (Ж). ¹H- и ³¹P-ЯМР-спектры записывали на спектрометрах Bruker WP-200-SY и Bruker AM-400 (Германия) в CDCl₃, D₂O или в дейтероацетоне. Для ¹H-ЯМР-спектров в качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан, для ³¹P-спектров в качестве внешнего стандарта –

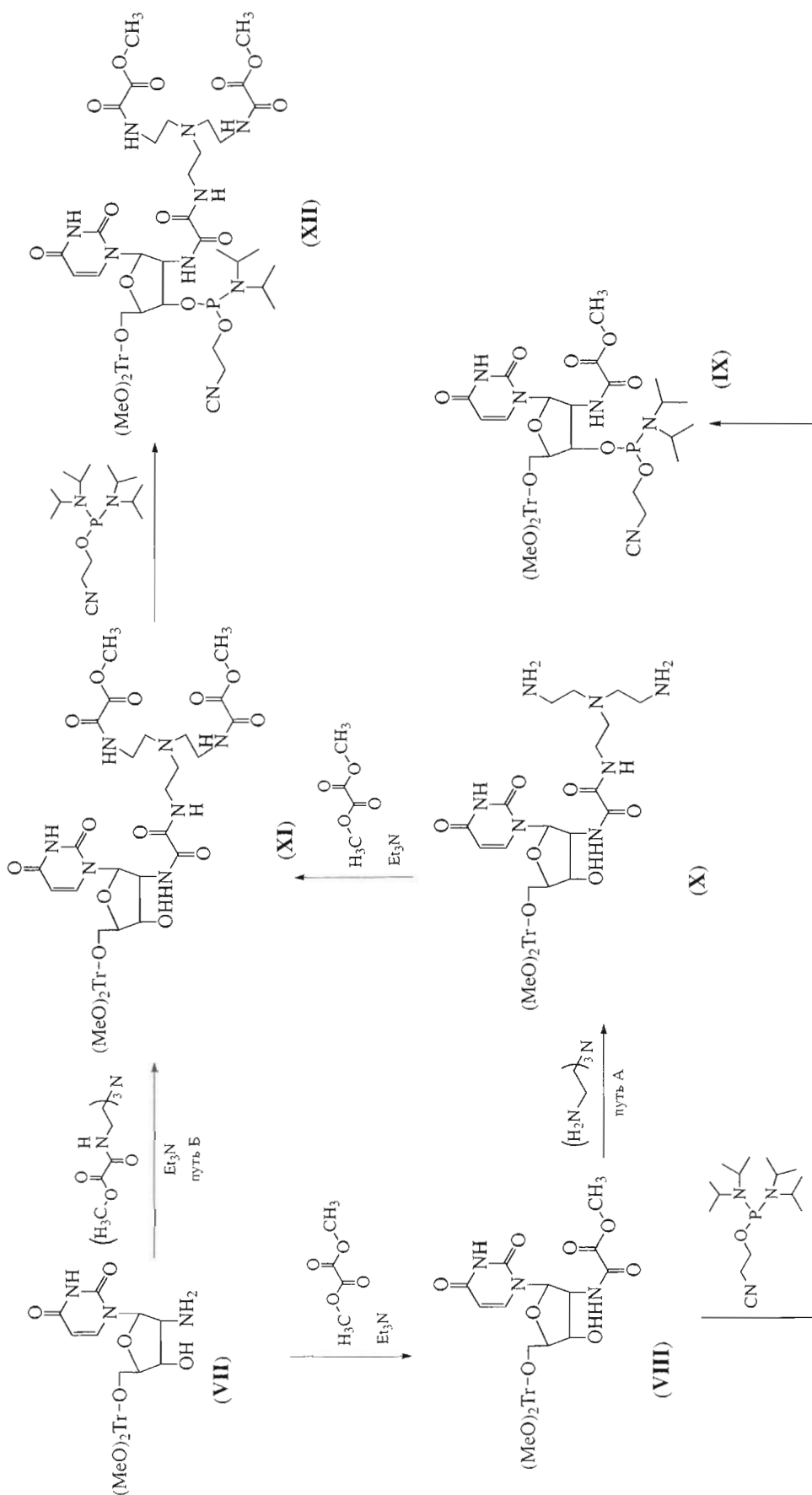


Схема 2. Синтез фосфорамидитных реагентов на основе уридина с одной (IX) и двумя (XII) метоксисалиламидными группами в 2'-положении.

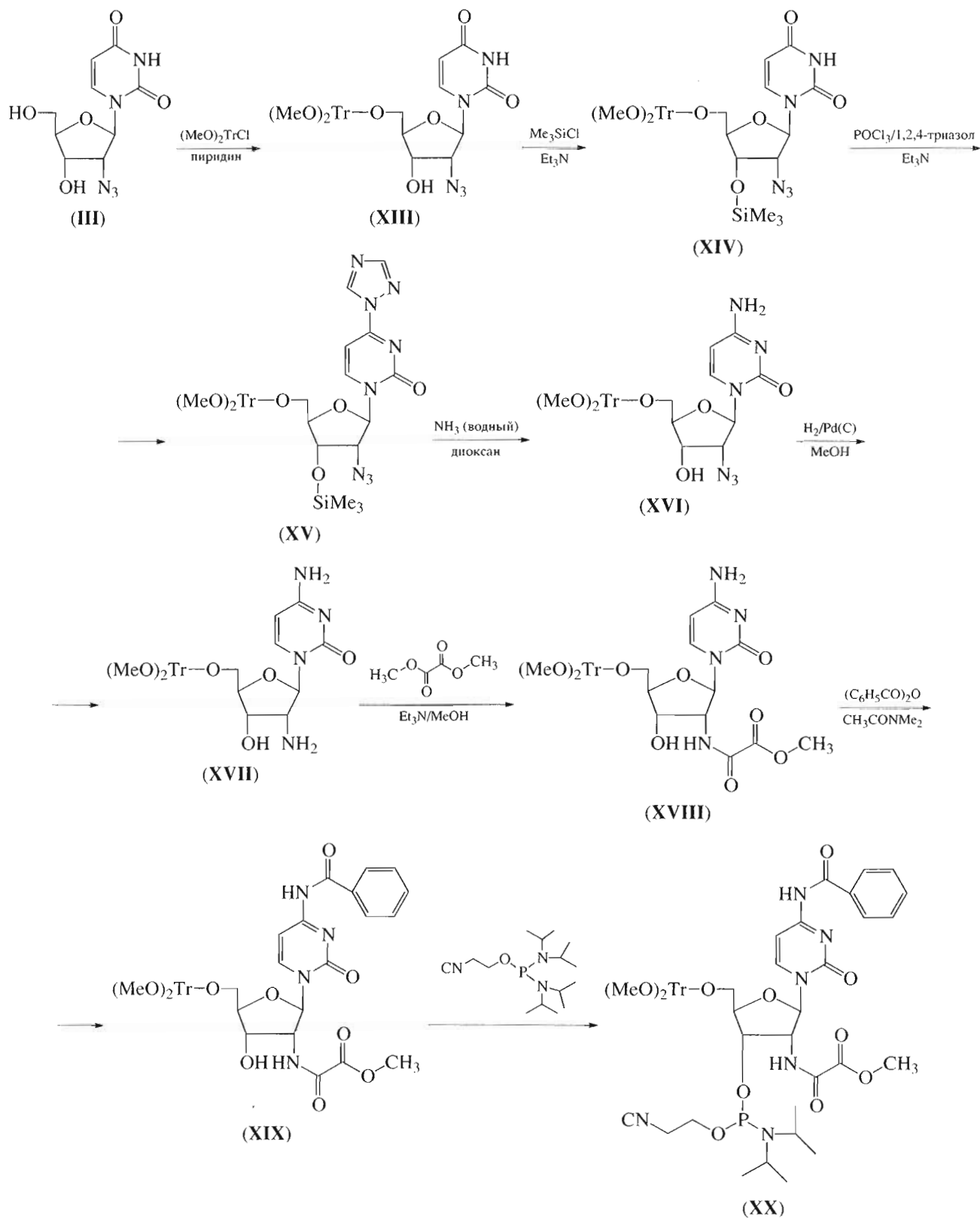


Схема 3. Синтез фосфамидитного реагента на основе цитидина, содержащего метоксиоксалиламидную группу в 2'-положении.

85% фосфорную кислоту в D₂O. Приведены химические сдвиги (δ , м. д.) и константы спин-спинового взаимодействия (J , Гц). Температуры плавления измеряли на столике Кофлера "VEB Analytik" (ГДР).

2,2'-О-Ангидро-1-(β -D-арабинофуранозил)урацил (II) был получен, как описано в работе [18], исходя из 40 г (0.16 моль) уридина (I) с выходом 95%.

2'-Амино-2'-дезоксисуридин (IV). Суспензию нуклеозида (II) (10 г, 44 ммоль), азида натрия (5.75 г, 88 ммоль) и дибензо-18-крауна-6 (3.2 г, 8.8 ммоль) в диметилацетамиде (200 мл) нагревали до 130–135°C при перемешивании в атмосфере аргона и выдерживали при этой температуре в течение 36 ч. Состав реакционной смеси анализировали методом ВЭЖХ. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, осадок отфильтровывали и промывали этиловым спиртом. Фильтрат и спиртовые промывки упаривали в вакууме. К остатку добавляли 200 мл воды, выпавший осадок отфильтровывали и промывали водой. Полученный водный раствор пропускали через колонку (4 × 18 см) с ионообменной смолой КРС-2п (H⁺-форма), затем колонку промывали водой. Все водные фракции упаривали. Получили неочищенный продукт – 2'-азидо-2'-дезоксисуридин (III) – в виде желто-коричневой пены. Аналитический образец был очищен хроматографически на колонке с силикагелем с обращенной фазой Preparative C 18 (Waters). Элюировали градиентом метанола 0 → 20% в воде. Целевые фракции упаривали, получив продукт в виде белой пены. R_f 0.66 (B). УФ-спектр (MeOH), λ_{max} , нм (ϵ): 260 (10179), ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 2114 (–N₃), ¹H-ЯМР-спектр (200 МГц, D₂O): 8.0 (1 H, д, J 8, H6); 6.11 (1 H, д, J 4, H1'); 6.12 (1 H, д, J 8, H5); 4.55 (1 H, т, J 5, H3'); 4.47 (1 H, дд, $J_{1,2}$ 4, $J_{2,3}$ 5, H2'); 4.24 (1 H, м, H4'); 4.03 (2 H, м, H5').

Суспензию 1 г катализатора (5% Pd/C) в метаноле (5 мл) при перемешивании насыщали водородом под давлением 1.5 атм., после чего добавляли раствор соединения (III) в метаноле (95 мл) и оставляли на ночь под давлением в 1.5 атм. водорода. Катализатор отфильтровывали и промывали несколько раз метанолом. Объединенные спиртовые фракции разбавляли водой в 5 раз и пропускали через колонку со смолой КРС-2п (H-форма, диаметр колонки 3 см, высота 7 см), колонку промыли 50 мл 20% раствора метанола в воде. Продукт элюировали со смолы 20 мл водного аммиака (25%) с последующей промывкой 15 мл 20% раствора метанола в воде. Целевые фракции упаривали, получили 4.8 г соединения (V) в виде пены, выход 44.8%. R_f 0.44 (Ж). $T_{пл}$ 197–198°C (этанол). УФ-спектр соответствует литературному [21], ¹H-ЯМР-спектр (400 МГц, D₂O): 7.94 (1 H, д, J 8, H6); 6.01 (1 H, д, J 8, H1'); 6.02 (2 H, д, J 8, H5); 4.32 (1 H, дд, $J_{3,4}$ 3, $J_{3,2}$ 6, H3'); 4.27 (1 H, дд, $J_{4,3}$ 3, $J_{4,5}$ 5, H4'); 3.96 (2 H, м, H5'); 3.68 (1 H, дд, $J_{2,1}$ 8, $J_{2,3}$ 6, H2').

2'-Амино-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксисуридин (VII). К смеси нуклеозида (IV) (8.6 г, 35.4 ммоль) и триэтиламина (9.85 мл, 70.8 ммоль) в сухом метаноле (90 мл) при перемешивании добавляли этиловый эфир трифторуксусной кислоты (8.42 мл, 70.8 ммоль). Через 2 ч реакционную смесь упаривали досуха, затем дважды упаривали с сухим пиридином. К раствору нуклеозида в пиридине (20 мл) на ледяной бане при перемешивании добавляли по каплям раствор 4,4'-диметокситритилхлорида (12.0 г, 35.4 ммоль) в пиридине (70 мл), выдерживали 1 ч, нагревали до комнатной температуры и оставляли на ночь. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 50 мл дихлорметана, промывали водой (2 × 50 мл) и 5% раствором бикарбоната натрия (50 мл). Органический слой упаривали, остаток растворяли в диоксане (70 мл), добавляли при перемешивании 140 мл водного аммиака (25%) и оставляли на ночь. Затем реакционную смесь упаривали, растворяли в 50 мл дихлорметана, промывали водой (2 × 50 мл) и 5% раствором бикарбоната натрия (50 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, упаривали до объема в 10 мл и осаждали гексаном (100 мл). Переосаждение повторили два раза. Получили 13 г порошка желтого цвета. Выход 67.3%. R_f 0.33 (B). УФ-спектр соответствует литературному [18]. ¹H-ЯМР-спектр (200 МГц, ацетон-*d*₆): 7.73 (1 H, д, J 8, H6); 7.49–7.21 (9 H, м, Ar); 6.80 (4 H, м, Ar); 6.01 (1 H, д, J 4, H1'); 5.40 (1 H, д, J 8, H5); 4.64 (1 H, дд, $J_{2,3}$ 7, $J_{3,4}$ 4, H3'); 4.34 (1 H, дд, $J_{2,1}$ 4, $J_{2,3}$ 7, H2'); 4.23 (1 H, м, H4'); 3.76 (6 H, с, CH₃); 3.47–3.30 (2 H, м, H5').

5'-О-(4,4'-Диметокситритил)-2'-метоксиоксалиламино-2'-дезоксисуридин (VIII). К раствору диметилосалата (640 мг, 5.4 ммоль) в метаноле (5 мл) при перемешивании по каплям добавляли раствор нуклеозида (VII) (536 мг, 0.98 ммоль) в смеси триэтиламина (750 мкл, 5.4 ммоль) и метанола (10 мл). Реакционную смесь выдерживали при 50°C в течение 10 ч и оставляли на ночь при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали до объема 3–4 мл и осаждали гексаном. Осадок хроматографировали на колонке с силикагелем, элюируя градиентом метанола 0 → 10% в хлороформе с 1% триэтиламина. Фракцию с продуктом упаривали, остаток растворяли в 2 мл хлороформа и осаждали 20 мл гексана. Осадок высушивали в вакууме. Получили 304 мг белого порошка. Выход 52%. R_f 0.71 (A). ¹H-ЯМР-спектр (400 МГц, CDCl₃): 8.10 (1 H, д, J 8, 2'-NH); 7.64 (1 H, д, J 8, H6); 7.38–7.20 (9 H, м, Ar); 6.81 (4 H, м, Ar); 6.21 (1 H, д, J 8, H1'); 5.40 (1 H, д, J 8, H5); 4.7 (1 H, м, H2'); 4.49 (1 H, дд, $J_{2,3}$ 5, $J_{3,4}$ 2, H3'); 4.2 (1 H, дд, $J_{3,4}$ 2, $J_{4,5}$ 3, H4'); 3.83 (3 H, с, CO₂CH₃); 3.76 (6 H, с, Ar, OCH₃); 3.42 (2 H, д, J 3, H5').

Общая методика получения фосфамидитных реагентов для олигонуклеотидного синтеза. К раствору защищенного нуклеозида (10 ммоль) и тетра-

золида диизопропиламмония (900 мг, 4.47 ммоль) в хлористом метиле (50 мл) при перемешивании добавляли порциями 4.5 мл (14 ммоль) и через 2 ч еще 2.2 мл (6.9 ммоль) 2-цианоэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропиламинофосфита. Через 3–7 ч (контроль ТСХ) реакционную смесь упаривали досуха, заливали гексаном и оставляли на ночь, затем гексан декантировали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. Элюировали градиентом метанола 0 → 10% в дихлорметане. Целевые фракции упаривали, продукт высаждали гексаном из дихлорметана, осадок сушили в вакууме.

5'-*O*-(4,4'-Диметокситритил)-2'-метоксиоксалиламино-3'-(2-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламино)фосфинил-2'-дезоксисуридин (IX). Продукт получили по стандартной методике исходя из 137 мг (0.22 ммоль) соединения (VIII). Реакция протекала 3.5 ч. Получили 116 мг белого порошка. Выход 64%. R_f 0.76 (Г). ^31P -ЯМР-спектр (400 МГц, CDCl_3): 151.4; 151.3.

2'-[*N,N*-Ди(2-метоксиоксалиламиноэтил)аминоэтил]-5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)аминооксалиламино-2'-дезоксисуридин (XI). К раствору трис(2-аминоэтил)амин (288 мкл, 1.92 ммоль) в метаноле (2 мл) при перемешивании добавляли порциями по 200 мкл в течение 1 ч раствор соединения (VIII) (304 мг, 0.48 ммоль) в метаноле (7 мл). Через 2 ч реакционную смесь упаривали, растворяли в 30 мл хлороформа с добавлением 1% триэтиламина. Раствор промывали водой (2 × 30 мл) и 5 М раствором хлорида натрия (30 мл). Органический слой высушивали над безводным сульфатом натрия, упаривали, затем упаривали с сухим ацетонитрилом (20 мл) и сухим метанолом (20 мл). Полученный продукт в виде белой пены (367 мг) растворяли в смеси метанол–триэтиламин (3 : 1, 8 мл) и при перемешивании прикапывали к раствору диметилосалата (579 мг, 4.9 ммоль) в метаноле (2 мл). Через 6 ч реакционную смесь упаривали до 2 мл и осаждали смесью гексан–диэтиловый эфир (1 : 1). Осадок хроматографировали на колонке с силикагелем. Элюировали градиентом метанола 0 → 10% в хлороформе с добавлением 1% триэтиламина. Фракции, содержащие продукт, упаривали, остаток растворяли в 2 мл дихлорметана и осаждали 20 мл эфира. Получили 235 мг белого порошка. Выход 54%. R_f 0.45 (А). ^1H -ЯМР-спектр (200 МГц, CDCl_3): 8.9 (1 Н, с, Н3); 8.4 (1 Н, д, J 8, 2'-NH); 7.9 (1 Н, т, J 5, $-\text{CONHCH}_2-$); 7.7 (2 Н, т, J 5, $-\text{CONHCH}_2-$); 7.65 (1 Н, д, J 8, Н6); 7.37–7.23 (9 Н, м, Ar); 6.81 (4 Н, м, Ar); 6.31 (1 Н, д, J 8, Н5); 4.58 (2 Н, м, Н2', Н3'); 4.26 (1 Н, дд, $J_{3,4}$ 1, $J_{4,5}$ 3, Н4'); 3.81 (6 Н, с, CO_2CH_3); 3.75 (6 Н, с, Ar, OCH_3); 3.44 (2 Н, д, $J_{4,5}$ 3, Н5'); 3.40 (6 Н, м, $-\text{CONHCH}_2-$); 2.7 (6 Н, м, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3$).

2'-[*N,N*-Ди(2-метоксиоксалиламиноэтил)аминоэтил]аминооксалиламино-5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-3'-(2-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламино)фосфинил-2'-дезоксисуридин (XII) был получен соглас-

но описанной методике исходя из нуклеозида (XI) (235 мг, 0.26 ммоль). Время реакции 7 ч. Получили 269 мг продукта в виде белого порошка. Выход 93%. R_f 0.65 (Д). ^31P -ЯМР-спектр (400 МГц, CDCl_3): 151.7; 151.4.

2'-Азидо-5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксисуридин (XIII) был получен по методике из работы [19] исходя из 2'-азидо-2'-дезоксисуридина (III) (1.66 г, 6.2 ммоль) с добавлением в реакционную смесь 4-(диметиламино)пиридина (189 мг, 1.6 ммоль). Выход 2.94 г (83%). R_f 0.66 (Б). ^1H -ЯМР-спектр (200 МГц, ацетон- d_6): 7.83 (1 Н, д, J 8, Н6); 7.48–7.26 (9 Н, м, Ar); 6.88 (4 Н, м, Ar); 5.9 (1 Н, д, J 8, Н1'); 5.34 (1 Н, д, J 8, Н5); 4.72 (1 Н, т, J 6, Н2'); 4.29 (1 Н, дд, $J_{2,3}$ 6, $J_{3,4}$ 4, Н3'); 4.11 (1 Н, м, Н4'); 3.77 (6 Н, с, CH_3); 3.48 (2 Н, д, $J_{4,5}$ 4, Н5').

2'-Азидо-5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-3'-*O*-триметилсиллил-2'-дезоксисуридин (XIV) был получен как описано в работе [18] исходя из 2.94 г (5.14 ммоль) соединения (XIII). Продукт выделили в виде пены. Выход 3.17 г (96%). R_f 0.72 (А). ^1H -ЯМР-спектр (200 МГц, ацетон- d_6): 7.85 (1 Н, д, J 5, Н6); 7.49–7.25 (9 Н, м, Ar); 6.93 (4 Н, м, Ar); 5.94 (1 Н, д, J 2, Н1'); 5.35 (1 Н, д, J 5, Н5); 4.71 (1 Н, т, J 3, Н2'); 4.24 (1 Н, дд, $J_{2,3}$ 3, $J_{3,4}$ 2, Н3'); 4.10 (1 Н, м, Н4'); 3.79 (6 Н, с, CH_3); 3.57–3.43 (1 Н, дд, $J_{4,5}$ 2, Н5'); 0.10 (9 Н, с, $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$).

2'-Азидо-5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезоксисцитидин (XVI) был получен по методике, аналогичной описанной в работе [19]. К раствору 1,2,4-триазола (6.79 г, 98.4 ммоль) в сухом ацетонитриле (20 мл), охлаждаемому на ледяной бане, при перемешивании добавили хлорокись фосфора (1.83 мл, 19.7 ммоль) и через 15 мин триэтиламин (13.7 мл, 98.4 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 30 мин, затем добавляли по каплям раствор соединения (XIV) (3.17 г, 4.92 ммоль) в сухом ацетонитриле (20 мл), после чего реакционную смесь нагревали до комнатной температуры. Через 1.5 ч реакционную смесь упаривали, растворяли в 40 мл хлороформа с добавлением 1% триэтиламина, промывали водой (2 × 20 мл) и 5 М раствором хлорида натрия (20 мл). Органическую фазу упаривали, растворяли в диоксане (25 мл), добавляли водный аммиак (25%, 25 мл) и перемешивали двое суток при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 30 мл хлористого метилена с добавлением 1% триэтиламина, промывали водой (2 × 20 мл) и 5 М раствором хлорида натрия (20 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, упаривали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. Элюировали градиентом метанола 0 → 20% в хлористом метиле с добавлением 1% триэтиламина. Целевые фракции упаривали, получили продукт в виде белой пены. Выход 451 мг (16%). R_f 0.27 (Б). ^1H -ЯМР-спектр (200 МГц, ацетон- d_6): 7.96 (1 Н, д, J 4, Н6); 7.49–7.22

(9 Н, м, Ar); 6.91 (4 Н, м, Ar); 5.86 (1 Н, д, $J_{2,1}$, H1'); 5.71 (1 Н, д, $J_{4,5}$, H5); 4.75 (1 Н, дд, $J_{1,2}$, 2, $J_{2,3}$, 3, H2'); 4.27 (1 Н, дд, $J_{2,3}$, 3, $J_{3,4}$, 2, H3'); 4.10 (1 Н, м, H4'); 3.76 (6 Н, с, CH_3); 3.48 (2 Н, д, $J_{4,5}$, 2, H5').

2'-Амино-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-2'-дезокситидин (XVII). Суспензию 140 мг катализатора (5% Pd/C) в метаноле (5 мл) при перемешивании насыщали водородом под давлением 1.5 атм. Затем добавляли раствор соединения (XVI) (191 мг, 0.33 ммоль) в метаноле (5 мл) и восстанавливали при 1.5 атм. в течение 2 ч. Затем катализатор отфильтровывали и промывали метанолом (2 × 10 мл). Объединенные спиртовые фракции упаривали, получили 160 мг белой пены. Выход 88%. R_f 0.38 (E). 1H -ЯМР-спектр (200 МГц, ацетон- d_6): 7.72 (1 Н, д, $J_{4,5}$, H6); 7.48–7.23 (9 Н, м, Ar); 6.88 (4 Н, м, Ar); 5.98 (1 Н, д, $J_{2,1}$, H1'); 5.70 (1 Н, д, $J_{4,5}$, H5); 4.62 (1 Н, м, H2'); 4.13–4.23 (2 Н, м, H3', H4'); 3.77 (6 Н, с, CH_3); 3.30–3.35 (2 Н, м, H5'); 2.80 (2 Н, уш. с, 2'-NH₂). Данные ЯМР соответствуют приведенным в работе [18].

5'-О-(4,4'-Диметокситритил)-2'-метоксиоксалиламида-2'-дезокситидин (XVIII). К раствору диметилосалата (349 мг, 2.96 ммоль) в метаноле (2 мл) при перемешивании по каплям добавляли раствор соединения (XVII) (160 мг, 0.29 ммоль) в смеси триэтиламина (821 мкл, 5.9 ммоль) и метанола (2 мл). Через 3 ч реакционную смесь упаривали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. Элюировали градиентом метанола 0 → 20% в хлористом метиле с добавлением 1% триэтиламина. Фракции с продуктом упаривали и осаждали гексаном (20 мл) из хлористого метилена (2 мл). Получили 177 мг белого порошка. Выход 97%. R_f 0.37 (B). 1H -ЯМР-спектр (200 МГц, ацетон- d_6): 7.98 (1 Н, д, $J_{4,5}$, H6); 7.47–7.29 (9 Н, м, Ar); 6.92 (4 Н, м, Ar); 6.26 (1 Н, д, $J_{4,1}$, H1'); 6.08 (1 Н, д, $J_{4,5}$, H5); 4.99 (1 Н, м, H2'); 4.29 (1 Н, м, H3'); 4.14 (1 Н, м, H4'); 3.77 (3 Н, с, CO_2CH_3); 3.69 (6 Н, с, OCH_3); 3.6–3.5 (2 Н, м, H5').

N⁴-Бензоил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-2'-метоксиоксалиламида-2'-дезокситидин (XIX). К раствору соединения (XVIII) (177 мг, 0.28 ммоль) в DMF (2 мл) при перемешивании добавляли бензойный ангидрид (63.3 мг, 0.308 ммоль) и оставляли на ночь. Реакционную смесь упаривали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем. Элюировали градиентом метанола 0 → 10% в дихлорметане с добавлением 0.1% пиридина. Фракции с продуктом упаривали и переосаждали гексаном (20 мл) из дихлорметана (2 мл). Получили 73 мг белого порошка. Выход 33%. R_f 0.71 (B). 1H -ЯМР-спектр (200 МГц, ацетон- d_6): 8.15 (3 Н, м, SO_2H_5 , H6); 7.53–7.33 (13 Н, м, Tr, SO_2H_5 , H5); 6.93 (4 Н, м, Tr); 6.34 (1 Н, д, $J_{8,1}$, H1'); 4.74 (2 Н, м, H2', H4'); 4.31 (1 Н, м, H3'); 3.79 (3 Н, с, CO_2OCH_3); 3.77 (6 Н, с, OCH_3); 3.51 (2 Н, м, H5').

N⁴-Бензоил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-2'-метоксиоксалиламида-3'-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфинил-2'-дезокситидин (XX) был получен по стандартной методике исходя из 73 мг (0.1 ммоль) нуклеозида (XIX). Время реакции 3 ч. Выход 52 мг (60%). ^{31}P -ЯМР-спектр (400 МГц, $CDCl_3$): 151.96; 151.61.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ 01-03-32439, 02-04-48664), Фонда содействия отечественной науке и грантом BRNE Res-008.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абрамова Т.В., Васильева С.В., Иванова Т.М., Шишкин Г.В., Сильников В.Н.* // Биоорганическая химия. 2004. Т. 30. С. 254–263.
2. *Зацепин Т.С., Романова Е.А., Орецкая Т.С.* // Успехи химии. 2002. Т. 71. С. 586–608.
3. *Mitsunobu O.* // Synthesis. 1981. P. 1–28.
4. *Meteliev V.G., Krynetskaya N.F., Purmal A.A., Shabarova Z.A., Tocik Z., Arnold L., Smrt J.* // Collect. Czech. Chem. Commun. 1990. V. 55. P. 2781–2786.
5. *Wohlrab F., Jamieson A.T., Hay J., Mengel R., Guschlbauer W.* // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 824. P. 233–242.
6. *Метелев В.Г., Крынецкая Н.Ф., Пурмаль А.А., Шабарова З.А.* // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 507–513.
7. *Романова Е.А., Орецкая Т.С., Сухомлинов В.В., Крынецкая Н.Ф., Метелев В.Г., Шабарова З.А.* // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 1348–1354.
8. *Шмидт С., Кузнецова Л.Г., Романова Е.А., Нуманн А., Орецкая Т.С., Крынецкая Н.Ф., Метелев В.Г., Шабарова З.А.* // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. С. 823–830.
9. *Кузнецова Л.Г., Романова Е.А., Волков Е.М., Таушлицкий В.Н., Орецкая Т.С., Крынецкая Н.Ф., Шабарова З.А.* // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 455–466.
10. *Manoharan M.* // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1489. P. 117–130.
11. *Suhadolnik R.J.* Nucleosides as Biological Probes. New York: Wiley Interscience, 1979.
12. *Suhadolnik R.J.* Nucleoside Antibiotics. New York: Wiley Interscience, 1970.
13. *Aurup H., Williams D.M., Eckstein F.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 9636–9641.
14. *Verlinde C.L., Callens M., van Aerschot A., Herdewijn P., Hannaert V., Michels P.A., Opperdoes F.R., Hol W.G.* // J. Med. Chem. 1994. V. 37. P. 3605–3613.
15. *Орецкая Т.С.* Направленная модификация олигонуклеотидов в процессе химического синтеза. Автореферат дис. ... д-ра хим. наук. М.: МГУ, 1997. 56 с.
16. *Kohgo S., Shinozuka K., Ozaki H., Sawai H.* // Tetrahedron Lett. 1998. V. 39. P. 4067–4070.
17. *Polushin N.N.* // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 3125–3133.
18. *McGee D.P.C., Settle A., Vargeese Ch., Zhai Y.* // J. Org. Chem. 1996. V. 61. P. 781–785.

19. McGee Danny P.C., Sebesta D.P., O'Rourke S.S., Martinez R.L., Jung M.E., Pieken W.A. // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 1995–1998.
20. McGee D.P.C., Vargeese Ch., Zhai Y., Kirschenheuter G.P., Settle A., Siedem C.R., Pieken W.A. // *Nucleosides Nucleotides.* 1995. V. 14. P. 1329–1339.
21. Verheyden J.P.H., Wagner D., Moffatt J.G. // *J. Org. Chem.* 1971. V. 36. P. 250–254.
22. Polushin N.N. // *Tetrahedron Lett.* 1996. V. 37. P. 3231–3234.
23. Polushin N.N. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 3125–3133.
24. Legorburu U., Reese C.B., Song Q. // *Tetrahedron.* 1999. V. 55. P. 5635–5640.
25. Bhat V., Ugarkar B.G., Sayeed V.A., Grimm K., Kosora N., Domenico P.A., Stocker E. // *Nucleosides Nucleotides.* 1989. V. 8. P. 179–183.
26. Гордон А., Форд Р. *Спутник химика.* Пер. с англ. М.: Мир, 1976. С. 437.

**Monomers for Oligonucleotide Synthesis
with Linkers Carrying Reactive Residues:
II. The Synthesis of Phosphoamidites on the Basis of Uridine
and Cytosine and Containing a Linker
with Methoxyoxalamide Groups in Position 2'**

S. V. Vasil'eva[#], T. V. Abramova, T. M. Ivanova, G. V. Shishkin, and V. N. Sil'nikov

[#] Phone: +7 (3832) 33-3762, e-mail: vasilieva_2001@ngs.ru
Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

A convenient preparative synthesis of 2'-amino-2'-deoxyuridine was developed. Starting from 2'-amino-2'-deoxyuridine and 2'-amino-2'-deoxycytidine, monomers for the phosphoamidite oligonucleotide synthesis were obtained that carry a linker with methoxyoxalamide groups in position 2'. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: 2'-amino-2'-deoxynucleosides, modified nucleosides, methoxyoxalamide groups