

Синтез реагентів на основі 7-заміщених 3-тіазолілкумаринів для ковалентного мічення олігонуклеотидів

Я.Б. Кузів¹, В.В. Іщенко², В.П. Хиля², І.Я. Дубей^{1*}

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

² Хімічний факультет Київського національного університету імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 62а, Київ, 01033, Україна

Резюме. Описано синтез карбоксильних похідних флуоресцентних зондів на основі 7-заміщених 3-тіазолілкумаринів для приєднання барвників до олігонуклеотидів та інших біомолекул. Ці реагенти включають 7-гідрокси-, 7-метокси- та 7-ацетоксипохідні 3-тіазоліл- і 3-(фенілтіазоліл)кумарину. Ключовими інтермедіатами синтезів були 7-гідроксипохідні відповідних кумаринів, що містять захищену карбоксиалкільну групу. 7-Метокси- та 7-ацетоксипохідні кумаринів і реагенти з вільною карбоксильною групою отримували комбінацією реакцій ацилювання чи метилювання й кислотного гідролізу.

Ключові слова: кумарини, флуоресцентні зонди, ковалентне мічення, олігонуклеотидні кон'югати.

Вступ. Успіхи у вивченні молекулярних процесів, які протікають у живих організмах, значною мірою зумовлені появою ефективних нерадіоактивних зондів, насамперед флуоресцентних. Без їх використання вже важко уявити розвиток молекулярної біології, біохімії, медицини та біотехнології. Дуже часто флуоресцентні та інші репортерні групи ковалентно зв'язують із біомолекулами — нуклеїновими кислотами, білками чи пептидами, ліпідами та ін. Так, флуоресцентно мічені білки застосовують в імунофлуоресцентному аналізі, в секвенуванні білків, під час вивчення їх клітинного метаболізму тощо. Олігонуклеотиди, що містять флуоресцентні групи, є потужним біоаналітичним інструментом, який широко використовують як ДНК/РНК-зонди у процесі твердофазної гібридизації та гомогенної детекції нуклеїнових кислот, у секвену-

ванні НК, полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), під час вивчення білково-нуклеїнової взаємодії [1, 2].

Зонди на основі кумаринів (наприклад, кумаринові барвники серії «Alexa Fluor» фірми «Molecular Probes») мають ефективну емісію у блакитній і фіолетовій ділянках спектра. У цьому спектральному діапазоні випромінює досить обмежена кількість сполук. Водночас «блакитні» флуорофори незамінні в ряді застосувань, особливо для багатоколірної флуоресцентної детекції (автоматичне секвенування НК, microarrays). Досить часто олігонуклеотидні кон'югати із кумаринами застосовують у методах, які ґрунтуються на ефекті FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Так, перші молекулярні зонди із двома флуорофорами були створені на основі пари 7-амінокумарин-флуоресцеїн [3].

Похідні кумаринів, як і інших репортерних молекул, найчастіше приєднують до олігонуклеотидів постсинтетично через аміноалкільний лінкер, уведений у відповідне положення

*Corresponding author.

Tel.: +38044-5265598

E-mail address: dubey@imbg.org.ua

біополімеру. Для приєднання до біомолекул використовували, наприклад, N-гідроксисукцинімідні естери по карбоксильній групі, введеній безпосередньо в положення C-3 кумарину [4] або через додатковий лінкер на основі 5-амінокапронової кислоти [3] чи гліцину [5]. Аліфатичну карбоксильну групу реагенту активували відповідним методом. У роботі [6] 7-аміно-4-трифторометилкумарин алкілували 1,3-дибромпропаном із подальшим заміщенням атома бромом в отриманій аміноалкілпохідній тіофосфатною групою, яка знаходилась на 3'-кінці олігонуклеотиду. Одержано C-рибозид, де агліконом слугувала похідна 7-амінокумарину. Цей нуклеозидний аналог уводили в олігонуклеотидну послідовність [7-10]. Отримані мічені олігомери застосували для вивчення структурної динаміки ДНК у пікосекундній часовій шкалі.

Для мічення олігонуклеотидів використовували 2'-аміно-2'-дезоксидуридин, NH₂-групу якого ацилювали сукцинімідним естером 7-гідрокси-3-карбоксикумарину. Одержану сполуку перетворили у фосфітамід для твердофазного олігонуклеотидного синтезу [11]. Описано приєднання кумаринів до нуклеозидів із використанням реакції Штаудингера (взаємодією карбоксипохідних кумаринів із 2-, 3- чи 5-азидонуклеозидами після їх активації трифенілфосфіном) [12], а також 1,3-диполярне циклоприєднання ацетиленових похідних кумаринів до азидонуклеозидів [13].

Спектр структур флуорофорів на основі кумаринового ядра досить обмежений. Найкращі оптичні характеристики мають 7-гідрокси- та 7-амінопохідні, які також можуть містити CH₃- чи CF₃-групу в положенні C-4 (уводять для підвищення фотостабільності), карбоксильну та CH₂COOH при C-3, іноді додаткові замісники в інших положеннях. Фірма «Molecular Probes» пропонує фторовані похідні 7-гідроксикумарину, що містять від одного до трьох атомів фтору [14]. Найкращі характеристики мають 6,8-дифторпохідні, в яких зростають фотостабільність і квантовий вихід флуоресценції. У роботі [15] досліджено ряд нових корових структур і методів введення лінкера для зв'язування кумаринових зондів із біополімерами. Запропоновано фосфітамідні реагенти, отримані фосфорилуванням гідрок-

сильних похідних кумаринів, які придатні для прямого введення в олігонуклеотид стандартним твердофазним синтезом.

Інтенсивність світіння кумаринового ядра часто збільшується, якщо в положення C-3 ввести гетероароматичний замісник. Метою цієї роботи був синтез похідних флуоресцентних 3-гетарилкумаринів, які містили б функціональну групу, здатну до зв'язування з біомолекулами. Для проведення кон'югації в барвники вводили карбоксильну групу, яка після активації може взаємодіяти з аміногрупою аміномодифікованого олігонуклеотиду чи білка. Ефективність кон'югації зростає, якщо COOH-група приєднана до репортерної молекули через лінкер оптимальної структури. Лінкерна група відповідної довжини необхідна також для того, щоб зменшити вплив приєданого ліганду на властивості біомолекули, наприклад, на гібридизацію олігонуклеотидних кон'югатів. Нами отримано серію 3-тіазолілкумаринів, що містять карбоксильну групу на аліфатичному лінкері.

Експериментальна частина. Використано розчинники й реактиви виробництва «Макрохім», «Хімлаборреактив» та «Укрреакхім» (Україна). Піридин і діетиловий етер сушили перегонкою над NaOH, інші розчинники використовували без додаткової очистки.

Тонкошарову хроматографію (ТШХ) проводили на пластинках «Kieselgel 60F₂₅₄» (Merck, Німеччина) у системі CHCl₃-MeOH 9:1.

Спектри протонного ЯМР отримували на спектрометрі «Varian Mercury» з робочою частотою 400 МГц, використовуючи тетраметилсилан як внутрішній стандарт. Величини хімічних зсувів наведено в м.д. Хромато-мас-спектри (LC-MS) записували на приладі «Agilent 1100LC/MSD SL» із детекцією катіонів та аніонів, обладнаному колонкою «Zorbax-C18 Rapid Resolution HT Cartridge» (2,1x30 mm, 1,8 μ) із використанням градієнта 0-100 % ацетонітрилу в 0,1%-вій мурашиній кислоті. Газову хромато-мас-спектроскопію (GC-MS) проводили на приладі «Hewlett Packard HP 6890 Series GC System», обладнаному детектором «HP 5973 Mass Selective Detector» і колонкою «Vebtron ZB5» («Phenomenex», 0,25 мм x 30 м), метод іонізації — електронний удар (70 eV).

Етил-6-хлоро-5-оксогексаноат (2a). Ди-

метиловий естер 2-ацетилглутарової кислоти **1a** (19,53 г, 85 ммоль) розчинили в сухому етері (120 мл) та охолодили льодом. По краплях додали бром (4,2 мл, 81 ммоль) за інтенсивного перемішування й залишили на ніч за кімнатної температури. Наступного дня розчинник випарили, залишок розчинили в суміші оцтової кислоти та концентрованої HCl (1:1) і залишили на 4 год за кімнатної температури, після чого розчин нагрівали за 80 °C протягом 3 год. Суміш випарили, додали 20 мл етанолу та 0,5 мл концентрованої сірчаної кислоти і кип'ятили протягом 3 год. Реакційну суміш розбавили CH₂Cl₂, промили водою і розчином бікарбонату натрію та випарили. Темно-коричневу масу перегнали у вакуумі (100–115 °C, 2,4–2,5 мбар). Одержали 10 г жовтої рідини (вміст α-хлоркетону **2a** 77 %, за даними GC-MS). Вихід **2a** 47 %.

GC-MS: R.t. 8,03 (4,43 %), 8,21 (13,68 %), 14,32 (4,37 %), 14,5 (77,4 %) хв. Мас-спектр основного піка: m/z 42 ([CH₂CO]⁺), 49 ([ClCH₂]⁺), 59 ([CH₂COCH₂]⁺), 77 ([ClCH₂CO]⁺), 95 ([ClCH₂COCH₂]⁺), 101 ([EtOCOCH₂CH₂]⁺), 119 ([ClCH₂CO(CH₂)₃]⁺), 129 ([EtOCO(CH₂)₃]⁺), 147 ([ClCH₂CO(CH₂)₃CO]⁺).

Етил-4-[2-ціанометил-1,3-тіазол-4-іл]бутаноат (3a). 2-ціантіоацетамід (5,64 г, 56,4 ммоль) розчинили в ізопропанолі (100 мл) при 70 °C і по краплях додали етиловий естер 6-хлоро-5-оксокапронової кислоти (10 г, чистота 77 %, 40 ммоль), суміш залишили за кімнатної температури на 48 год. Розчин випарили до об'єму ~40 мл і розбавили 5%-ним аміаком, екстрагували EtOAc, органічний шар промили водою, висушили над Na₂SO₄ та випарили у вакуумі. Одержане масло (12 г) використали без додаткової очистки.

Етил-4-[2-(7-гідрокси-2-оксо-2H-3-хромєніл)-1,3-тіазол-4-іл]бутаноат (4a). 2,4-дигідроксibenзальдегід (6,1 г, 44 ммоль) розчинили в ізопропанолі (50 мл), цю суміш додали до сполуки **3a** (12 г). Після повного розчинення додали кілька крапель піперидину. Через 12 год реакційну суміш випарили у вакуумі, отримане масло обробили 50%-ною водною HOAc. Жовті кристали відфільтрували, промили водою та висушили (вихід 3,98 г). Продукт перекристалізували із суміші спирт-вода (5:2) (2,08 г). Додаткову порцію речовини (270 мг) отримали із маточного розчину. Су-

марно одержали 2,35 г (8 % відносно **1a**) продукту, що містив деяку кількість ізопропілового естеру (за даними ¹H ЯМР). Тому частину сирові **4a** (1,8 г) розчинили в етанолі (180 мл), додали 4 мл сірчаної кислоти та залишили на 6 днів. Реакційну суміш нейтралізували концентрованим аміаком, сульфат амонію відфільтрували, розчин випарили у вакуумі. Залишок двічі перекристалізували з етилового спирту. Одержали жовті кристали (0,96 г, вихід переетерифікації 53 %). R_f 0,76, T_{пл} 173–174 °C.

LC-MS: m/z 360 ([M+1]⁺). ¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 1,22 (t, 3H, J=7,2 Hz, CH₃), 2,0 (quint, 2H, J=7,2 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,33 (t, 2H, J=7,2 Hz, CH₂COO), 2,8 (t, 2H, J=7,2 Hz, CH₂CH₂CH₂COO), 4,60 (q, 2H, J=7,2 Hz, OCH₂), 6,77 (d, 1H, J=2 Hz, 8-H), 6,83 (dd, 1H, J=2 Hz, J=8,4 Hz, 6-H), 7,2 (s, 1H, 5-тіазол), 7,67 (d, 1H, J=8,4 Hz, 5-H), 8,78 (s, 1H, 4-H), 10,73 (s, 1H, OH).

Етил-4-[2-(7-ацетокси-2-оксо-2H-3-хромєніл)-1,3-тіазол-4-іл]бутаноат (5a). Сполуку **4a** (0,26 г, 0,72 ммоль) розчинили в сухому піридині (1,5 мл) і додали Ac₂O (0,3 мл, 3 ммоль). Реакційну суміш залишили на два дні, потім вилили у воду, осад відфільтрували, промили водою та висушили. Отримали 120 мг продукту (69 %). R_f 0,93, T_{пл} 128–129 °C.

LC-MS: m/z 402 ([M+1]⁺). ¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 1,23 (t, 3H, J=7,2 Hz, CH₃), 2,02 (quint, 2H, J=7,2 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,33–2,36 [(s, 3H, CH₃CO), (t, 2H, CH₂COO)], 2,83 (t, 2H, J=7,2 Hz, CH₂CH₂CH₂COO), 4,07 (q, 2H, J=7,2 Hz, OCH₂), 7,17 (dd, 1H, J=8,4 Hz, J=2 Hz, 6-H), 7,29 (d, 1H, J=2 Hz, 8-H), 7,34 (s, 1H, 5-тіазол), 7,97 (d, 1H, J=8,4 Hz, 5-H), 8,92 (s, 1H, 4-H).

Етил-4-[2-(7-метокси-2-оксо-2H-3-хромєніл)-1,3-тіазол-4-іл]бутаноат (6a). Сполуку **4a** (0,54 г, 1,5 ммоль), диметилсульфат (0,18 мл, 1,9 ммоль) і карбонат натрію (0,27 г, 2,5 ммоль) кип'ятили в сухому ацетоні. Після закінчення реакції (контроль ТПХ) суміш вилили у воду, осад відфільтрували, промили водою та висушили. Одержали жовті кристали (0,465 г, вихід 83 %). R_f 0,93, T_{пл} 145–146 °C.

LC-MS: m/z 374 ([M+1]⁺). ¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 1,23 (t, 3H, J=6,8 Hz, CH₃), 2,01 (quint, 2H, J=7,2 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,34 (t, 2H, J=7,2 Hz, CH₂COO), 2,81 (t, 2H, J=7,2 Hz, CH₂CH₂CH₂COO), 4,07 (q, 2H, 6,8 Hz, OCH₂), 6,95 (d, 1H, J=8,8 Hz,

6-Н), 7,03 (s, 1H, 8-Н), 7,25 (s, 1H, 5-тіазол), 7,8 (d, 1H, $J=8,8$ Hz, 5-Н), 8,83 (s, 1H, 4-Н).

4-[2-(7-метокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)-1,3-тіазол-4-іл]бутанова кислота (7a). Сполуку **7a** (0,27 г, 0,72 ммоль) кип'ятили в суміші HOAc/HCl (5:2). Після закінчення реакції суміш розбавили водою, осад відфільтрували, промили водою та висушили. Вихід 0,24 г (96 %). R_f 0,44, $T_{\text{пл}}$ 216-217 °C.

LC-MS: m/z 346 ($[M+1]^+$). ^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 1,98 (quint, 2H, $J=7,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,28 (t, 2H, $J=7,4$ Hz, CH_2COO), 2,81 (t, 2H, $J=7,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 3,9 (s, 3H, OCH_3), 6,95 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, 6-Н), 7,02 (s, 1H, 8-Н), 7,25 (s, 1H, 5-тіазол), 7,81 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, 5-Н), 8,85 (s, 1H, 4-Н).

4-[2-(7-гідрокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)-1,3-тіазол-4-іл]бутанова кислота (8a). Сполуку **4a** (0,8 г, 2,23 ммоль) суспендували в суміші HOAc/HCl (1:1) і нагрівали 6 год при 60-70 °C, потім залишили на ніч за кімнатної температури. Розчин розвели водою, осад відфільтрували та перекристалізували з етанолу (25 мл). Отримали жовті кристали (0,56 г, 75 %). R_f 0,29, $T_{\text{пл}}$ 268-270 °C.

^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 1,98 (quint, 2H, $J=7,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,28 (t, 2H, $J=7,6$ Hz, CH_2COO), 2,81 (t, 2H, $J=7,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 6,77 (d, 1H, $J=2$ Hz, 8-Н), 6,83 (dd, 1H, $J=8,8$ Hz, $J=2$ Hz, 6-Н), 7,23 (s, 1H, 5-тіазол), 7,71 (d, 1H, $J=8,8$ Hz, 5-Н), 8,81 (s, 1H, 4-Н), 10,68 (s, 1H, OH), 12 (s, 1H, COOH).

4-[2-(7-ацетокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)-1,3-тіазол-4-іл]бутанова кислота (9a). Сполуку **8a** (0,28 г, 0,84 ммоль) розчинили при нагріванні в піридині (1,5 мл) і додали оцтовий ангідрид (0,3 мл, 3 ммоль). Реакційну суміш залишили на ніч за кімнатної температури, потім вилили у воду, осад відфільтрували, промили водою та висушили. Вихід 250 мг (79 %). R_f 0,44, $T_{\text{пл}}$ 151,5-155 °C.

LC-MS: m/z 374 ($[M+1]^+$). ^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 1,99 (quint, 2H, $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,28 (t, 2H, $J=7,2$ Hz, CH_2COO), 2,33 (s, 3H, CH_3CO), 2,84 (t, 3H, $J=7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 7,16 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz, $J=1,2$ Hz, 6-Н), 7,28 (d, 1H, $J=1,2$ Hz, 8-Н), 7,35 (s, 1H, 5-тіазол), 7,99 (d, 1H, 5-Н), 8,94 (s, 1H, 4-Н), 12 (s, 1H, COOH).

Етил-4-(4-ацетилфенокси)бутаноат (1b). n -Гідроксиацетофенон (3,8 г, 0,28 ммоль) роз-

чинили у ДМФ (30 мл), додали свіжопрожарений поташ (5,1 г) і довели розчин до кипіння (інтенсивно виділяється CO_2). Увели по краплях етил-4-бромобутират (5,46 г, 28 ммоль). Суміш кип'ятили ще 20 хв і вилили у воду. Осад відфільтрували та перекристалізували із водного спирту. Вихід 5,4 г (77 %). $T_{\text{пл}}$ 59-60 °C.

^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 1,22 (t, 3H, $J=7,2$ Hz, CH_3), 2,03 (quint, 2H, $J=6,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,5 (t, 2H, $J=6,8$ Hz, CH_2COO), 2,4-2,5 (s, CH_3CO збігся із DMSO), 4,05-4,1 (m, (q, 2H, OCH_2CH_3), (t, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$)), 6,95 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, 2-Ph, 6-Ph), 7,87 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, 3-Ph, 5-Ph).

Етил-4-[4-(бромацетил)фенокси]бутаноат (2b). Ацетофенон **1b** (7 г, 28 ммоль) розчинили у 50 мл етилового спирту. Розчин нагріли до 45 °C і додали бром (1,3 мл, 0,025 моль) порціями по 0,1 мл. Коли розчин знебарвився, реакційну суміш вилили у воду. Випало масло, яке швидко закристалізовується, коли злити із нього воду. Отримали 8,66 г сірих кристалів, які далі використовували без додаткової очистки (за даними ^1H ЯМР, містять ~15 % непробромованого ацетофенону). Під час кристалізації аналітичного зразка із суміші етанол-вода (7:3) отримали білі кристали. $T_{\text{пл}}$ 38-40 °C.

^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1,26 (t, 3H, $J=7,2$ Hz, CH_3), 2,13 (quint, 2H, $J=7,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,51 (t, 2H, $J=7,0$ Hz, CH_2COO), 4,08 (t, 2H, $J=7,0$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4,14 (q, 2H, $J=7,2$ Hz, OCH_2CH_3), 4,35 (s, 2H, BrCH_2), 6,92 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, 2-Ph, 6-Ph), 7,93 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, 3-Ph, 5-Ph).

Етил-4-[4-(2-ціанометил-1,3-тіазол-4-іл)фенокси]бутаноат (3b). У 30 мл ізопропанолу розчинили під час нагрівання (~60 °C) ціантоацетамід (2,87 г, 0,0287 моль). Потім додали сиру бромацетильну похідну **2b** (8,66 г, 0,0242 моль), витримали суміш, нагріваючи кілька годин, а потім залишили на дві доби за кімнатної температури. Утворені кристали (гідробромід тіазолу) промили ізопропанолом, додали до них надлишок розбавленого водного аміаку й перемішували кілька годин. Осад відфільтрували, промили водою та висушили, отримавши 5,48 г продукту (вихід 59 % відносно **1b**). R_f 0,8, $T_{\text{пл}}$ 62-64 °C.

^1H ЯМР (DMSO- d_6): δ 1,23 (t, 3H, $J=8$ Hz, CH_3), 2,02 (quint, $J=7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,46 (t, 2H, $J=7$ Hz, CH_2COO), 4,02 (t, 2H, $J=8$ Hz,

OCH₂), 4,08 (q, 2H, OCH₂CH₃), 4,47 (s, 1H, CH₂CN), 6,92 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, 2-Ph, 6-Ph), 7,78 (s, 1H, 4-тіазол), 7,84 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, 3-Ph, 5-Ph).

Етил-4-{4-[2-(7-гідрокси-2-іміно-2Н-3-хроменіл)-1,3-тіазол-4-іл]фенокси}бутаноат (4b). Ціанометилтіазол **3b** (630 мг, 1,9 ммоль) і 2,4-дигідроксибензальдегід (310 мг, 2,25 ммоль) розчинили в ізопропанолі під час нагрівання до ~55 °С. Додали кілька крапель піперидину, приблизно через 20 хв почав випадати осад. Реакційну суміш залишили за кімнатної температури на ніч. Лимонно-жовті кристали відфільтрували, промили ізопропанолом і висушили. Вихід 844 мг (98 %). *T*_{пл} — осмолується без плавлення при ~190 °С.

¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 1,23 (t, 3H, *J*=7,2 Hz, CH₃), 2,04 (quint, 2H, *J*=7,0 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,45 (t, 2H, *J*=7,0 Hz, CH₂COO), 4,02 (t, 2H, *J*=7,0 Hz, OCH₂), 4,08 (q, 2H, *J*=7,2 Hz, OCH₂CH₃), 6,59 (s, 1H, 8-Н), 6,69 (d, 1H, *J*=8,2 Hz, 6-Н), 7,00 (d, 2H, *J*=8,2 Hz, 2-Ph, 6-Ph), 7,62 (d, 1H, *J*=8,2 Hz, 5-Н), 7,79-7,99 (m, 3H, 3-Ph, 5-Ph, 4-тіазол), 8,55 (s, 1H, 4-Н, не обмінюється з D₂O), 8,77 (s, 1H, NH, обмінюється з D₂O), 10,54 (s, 1H, OH, обмінюється з D₂O).

Етил-4-{4-[2-(7-гідрокси-2-оксо-2Н-3-хроменіл)-1,3-тіазол-4-іл]фенокси}бутаноат (5b). Імінокумарин **4b** (750 мг, 1,67 ммоль) гідролізували у 3%-ній сірчаній кислоті за 60 °С протягом доби, періодично опромінюючи в ультразвуковій бані. Осад відфільтрували, промили водою і висушили. Одержали 750 мг коричневої речовини. Перекристалізували з піридину (5 мл), осад промили піридином та спиртом і висушили за 120 °С, одержавши лимонно-жовті кристали (70 мг). Маточний розчин розвели спиртом у два рази, осад відфільтрували, промили CH₃OH, після висушування отримали 290 мг. Сумарний вихід становив 360 мг (47 %). *R*_f 0,81, *T*_{пл} 219-220 °С (осмолується).

¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 1,23 (t, 3H, *J*=7,2 Hz, OCH₂CH₃), 2,03 (quint, 2H, *J*=6,8 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,4-2,5 (CH₂COO збігся із DMSO), 4,02 (t, 2H, *J*=6,8 Hz, OCH₂), 4,08 (q, 2H, *J*=7,2 Hz, OCH₂CH₃), 6,79 (d, 1H, *J*=2 Hz, 8-Н), 6,85 (dd, 1H, *J*=2 Hz, *J*=8,8 Hz, 6-Н), 6,93 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, 2-Ph, 6-Ph), 7,71 (d, 1H, *J*=8,8 Hz, 5-Н), 7,81 (s, 1H, 4-тіазол), 7,93 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, 3-Ph, 5-Ph), 8,93 (s, 1H, 4-Н), 10,8 (s, 1H, OH).

4-{4-[2-(7-гідрокси-2-оксо-2Н-3-хроменіл)-1,3-тіазол-4-іл]фенокси}бутанова кислота (6b). Етиловий естер **5b** (200 мг, 0,44 ммоль) суспендували в 13 мл ~7%-го NaOH і перемішували протягом доби. Розчин нейтралізували розведеною сірчаною кислотою до рН ~6, осад відфільтрували, промили водою та висушили. Отримали жовті кристали (110 мг, вихід 57 %). *R*_f 0,29, *T*_{пл} 268-270 °С.

¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 2,03 (q, 2H, *J*=6,8 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,42 (t, 2H, *J*=6,8 Hz, CH₂COO), 4,05 (t, 2H, *J*=6,8 Hz, OCH₂), 6,8 (d, 1H, *J*=2 Hz, 8-Н), 6,87 (dd, 1H, *J*=2 Hz, *J*=8,8 Hz, 6-Н), 6,95 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, 2-Ph, 6-Ph), 7,74 (d, 1H, *J*=8,8 Hz, 5-Н), 7,83 (s, 1H, 4-тіазол), 7,96 (d, 2H, *J*=8,8 Hz, 3-Ph, 5-Ph), 8,96 (s, 1H, 4-Н), 10,74 (s, 1H, OH), 12 (s, 1H, COOH).

4-{4-[2-(7-ацетокси-2-оксо-2Н-3-хроменіл)-1,3-тіазол-4-іл]фенокси}бутанова кислота (7b). Кислоту **6b** (0,31 г, 0,73 ммоль) упарили із сухим піридином (5 мл), потім розчинили у 5 мл цього ж розчинника під час нагрівання та додали 1 мл оцтового ангідриду. Реакційну суміш витримали 3 год за кімнатної температури, випарили, залишок перекристалізували з піридину (1 мл). Одержали лимонно-жовті кристали (250 мг, 74 %). *R*_f 0,52, *T*_{пл} 229-230 °С.

¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 2,01 (quint, 2H, *J*=7 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,34 (s, 3H, CH₃CO), 2,42 (t, 2H, *J*=7 Hz, CH₂COO), 4,06 (t, 2H, *J*=7 Hz, OCH₂), 6,99 (d, 1H, *J*=8 Hz, 2-Ph, 6-Ph), 7,22 (d, 1H, *J*=8 Hz, 6-Н), 7,36 (s, 1H, 8-Н), 7,95-8,06 (m, 4H, 4-тіазол, 3-Ph, 5-Ph, 5-Н) 9,1 (s, 1H, 4-Н).

Метил-4-{4-[2-(7-метокси-2-оксо-2Н-3-хроменіл)-1,3-тіазол-4-іл]фенокси}бутаноат (8b). До кислоти **6b** (1,057 г, 2,5 ммоль) у 40 мл сухого ацетону додали диметилсульфат (0,6 мл, 6,3 ммоль) і свіжопрожарений поташ (1,3 г). Кип'ятили 40 хв, після цього залишили на дві доби за кімнатної температури. Суміш вилили у воду, осад відфільтрували, промили водою та висушили. Перекристалізували із суміші ДМФ-етанол 1:1 (20 мл) із активованим вугіллям. Отримали лимонно-жовті кристали (380 мг, 33 %). Із маточного розчину додатково виділили 310 мг продукту. Сумарний вихід 690 мг (60 %). *R*_f 1, *T*_{пл} 180-182 °С.

¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 2,05 (quint, 2H, *J*=6,8 Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,4-2,6 (CH₂COOH збігся

із DMSO), 3,64 (s, 3H, COOCH₃), 3,92 (s, 3H, OCH₃), 4,04 (t, 2H, $J=6$ Hz, OCH₂), 6,94 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, 2-Ph, 6-Ph), 6,99 (d, 1H, $J=8,8$ Hz, 6-H), 7,06 (s, 1H, 8-H), 7,83-7,86 (m, 2H, 4-тіазол, 5-H), 7,96 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, 3-Ph, 5-Ph), 8,99 (s, 1H, 4-H).

4-{4-[2-(7-метокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)-1,3-тіазол-4-іл]фенокси}бутанова кислота (9b). 310 мг (0,69 ммоль) сполуки **8b** (отриманих із маточного розчину на попередньому етапі) розчинили в суміші HOAc/HCl 1:1 (40 мл) і кип'ятили 4 год. Додали 20 мл води, кип'ятили суміш ще 1 год і залишили на ніч за кімнатної температури. Осад відділили центрифугуванням (5000 об/хв, 10 хв), промили спиртом (20 мл) і повторно відцентрифугували та висушили. Перекристалізували із 2 мл піридину. Отримали 70 мг лимонно-жовтих кристалів (23 %). R_f 0,56, $T_{пл}$ 270-272 °C.

¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 2,03 (quint, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2,42 (t, 2H, $J=7,2$ Hz, CH₂COO), 3,92 (s, 3H, OCH₃), 4,05 (t, 2H, $J=7,2$ Hz, OCH₂), 6,9-7,0 (m, 3H, 2-Ph, 6-Ph, 6-H), 7,7 (s, 1H, 8-H), 7,84 (d, 1H, $J=8$ Hz, 5-H), 7,86 (s, 1H, 4-тіазол), 7,98 (d, 2H, $J=8$ Hz, 3-Ph, 5-Ph), 9,03 (s, 1H, 4-H).

Метил-4-{4-[2-(7-гідрокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)-1,3-тіазол-4-іл]фенокси}бутаноат (10b). До **6b** (1,05 г, 2,5 ммоль) у 50 мл метанолу додали 2 мл концентрованої сірчаної кислоти і кип'ятили 4 год. Після охолодження лимонно-жовті кристали відфільтрували, промили водою та висушили у вакуумі масляного насосу. Вихід 860 мг (78 %). Порцію речовини (572 мг) перекристалізували з піридину (2 мл). Одержали 374 мг (вихід кристалізації 65 %). R_f 0,81, $T_{пл}$ 205-212 °C.

¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 2,05 (quint, 2H, $J=6,8$ Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,45-2,55 (CH₂COO збігся із DMSO-d₆), 3,64 (s, 3H, OMe), 4,05 (t, 2H, $J=6,4$ Hz, OCH₂), 6,79 (d, 1H, $J=2$ Hz, 8-H), 6,86 (dd, 1H, $J=2$ Hz, $J=8,4$ Hz, 6-H), 6,94 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, 2-Ph, 6-Ph), 7,73 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, 5-H), 7,83 (s, 1H, 4-тіазол), 7,96 (d, 2H, $J=8,8$ Hz, 3-Ph, 5-Ph), 8,95 (s, 1H, 4-H), 10,8 (s, 1H, OH).

Метил-4-{4-[2-(7-ацетокси-2-оксо-2H-3-хроменіл)-1,3-тіазол-4-іл]фенокси}бутаноат (11b). Сполуку **10b** (0,31 г, 0,71 ммоль) розчинили в піридині (4 мл) під час нагрівання та додали оцтовий ангідрид (0,2 мл, 2,1 ммоль). Реакційну суміш витримали 3 год при 70 °C і за-

лишили на ніч за кімнатної температури. Потім вилили її у воду, віділили 345 мг продукту, який перекристалізували із піридину (3 мл). Отримали лимонно-жовті кристали (210 мг, 62 %). R_f 0,94, $T_{пл}$ 192-194 °C.

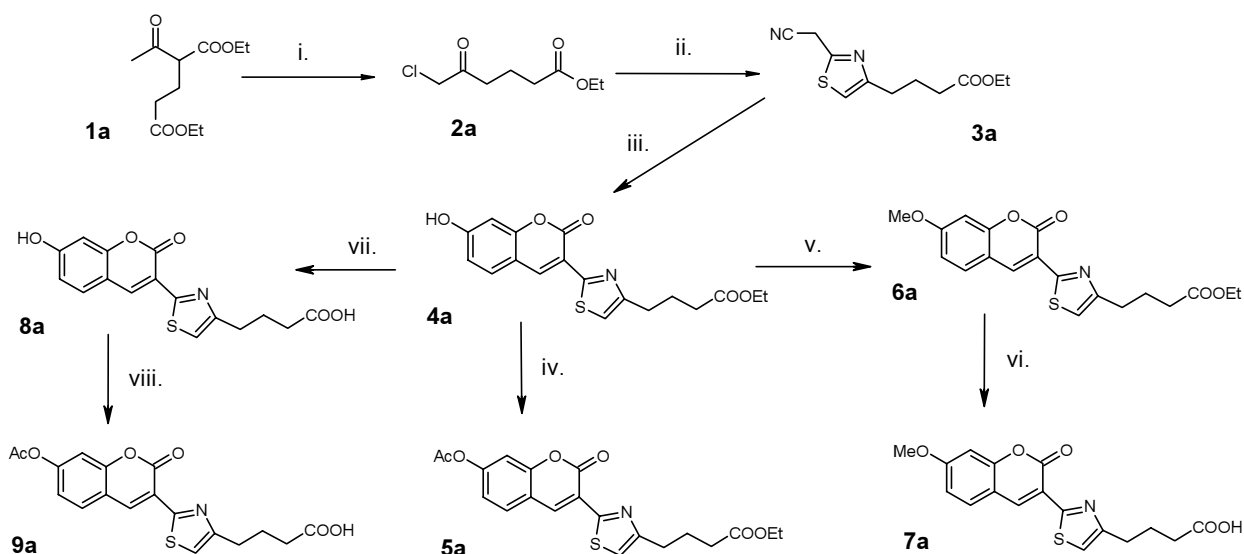
¹H ЯМР (DMSO-d₆): δ 2,05 (quint, 2H, $J=6,8$ Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,34 (s, 3H, CH₃CO), 2,45-2,55 (CH₂COO збігся із DMSO), 3,64 (s, 3H, OCH₃), 4,05 (t, 2H, $J=6,8$ Hz, OCH₂), 6,95 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, 2-Ph, 6-Ph), 7,19 (dd, 1H, $J=8,4$ Hz, $J=2$ Hz, 6-H), 7,30 (d, 1H, $J=2$ Hz, 8-H), 7,93-8,01 (m, 4H, 4-тіазол, 3-Ph, 5-Ph, 5-H), 9,06 (s, 1H, 4-H).

Результати й обговорення. Нами розроблено методи синтезу серії похідних 7-гідрокси-3-гетарилкумарину, які містять карбоксиалкільну групу, для проведення реакції кон'югації барвників із аміноалкіл-модифікованими олігонуклеотидами чи іншими аміновмісними біомолекулами. Принципово можливе приєднання COOH-модифікованих репортерних молекул і до гідроксильних сполук через естерний зв'язок, хоча цей підхід використовують досить рідко.

Як гетероароматичний замісник у положенні С-3 кумаринового ядра використали тіазол і 4-фенілтіазол. При початковій оцінці інтенсивності флуоресценції великої серії 3-гетарилзаміщених кумаринів тіазольні похідні продемонстрували особливо яскраве світіння, тому здавалось природним отримання реагентів на основі саме цих похідних. Загальні методи синтезу кумаринових систем із 3-гетарильними замісниками розглянуто в роботах [16-18]. Ми вирішили провести синтез шляхом конденсації 2,4-дигідроксибензальдегіду з певним заміщеним ацетонітрилом. Тіазоли із ціанметильною групою в положенні С-2 отримували взаємодією ціантіоацетаміду та відповідного α -галогенкетону, як описано в [19]. У барвники вводили COOH-групу на алкільному лінкері, який складається з трьох метиленових ланок. Вибір такого лінкера був обумовлений доступністю потрібних реагентів і простою синтезу. Щоб мінімізувати вплив замісників на флуоресценцію кумаринового ядра, лінкерну групу вводили в гетарильну частину молекули.

Електронні спектри поглинання та флуоресценції можуть відрізнитися для кумаринів

Синтез тіазолільних похідних кумаринів



Примітки. (i). 1. Br_2 , Et_2O , 0°C , 2. HCl-HOAc 1:2, 80°C , 3. MeOH , H_2SO_4 ; (ii). $\text{NCCH}_2\text{C(S)NH}_2$, ізопропанол; (iii). 1. 2,4-дигідроксibenзальдегід, піперидин, 2. EtOH , H_2SO_4 ; (iv). Ac_2O , Py ; (v). Me_2SO_4 , ацетон, K_2CO_3 ; (vi). HCl-HOAc 1:2, $100\text{-}110^\circ\text{C}$; (vii). HCl-HOAc 1:2, $60\text{-}70^\circ\text{C}$; (viii). Ac_2O , Py .

із вільною карбоксильною групою та барвників, зв'язаних з іншою молекулою через амідний чи естерний зв'язок, оскільки в останньому випадку залишок кумарину вже не містить рухливого кислотного протона. Тому для контролю бажано було одержати й похідні кумаринів нейтрального характеру — в нашому випадку це були естери (їх отримання технічно простіше, ніж синтез амідів).

У результаті синтезували дві серії кумаринових похідних із вільною та захищеною карбоксиалкільною групою — із 3-тіазольним і 3-фенілтіазольним замісником (сполуки відповідно серій а та б).

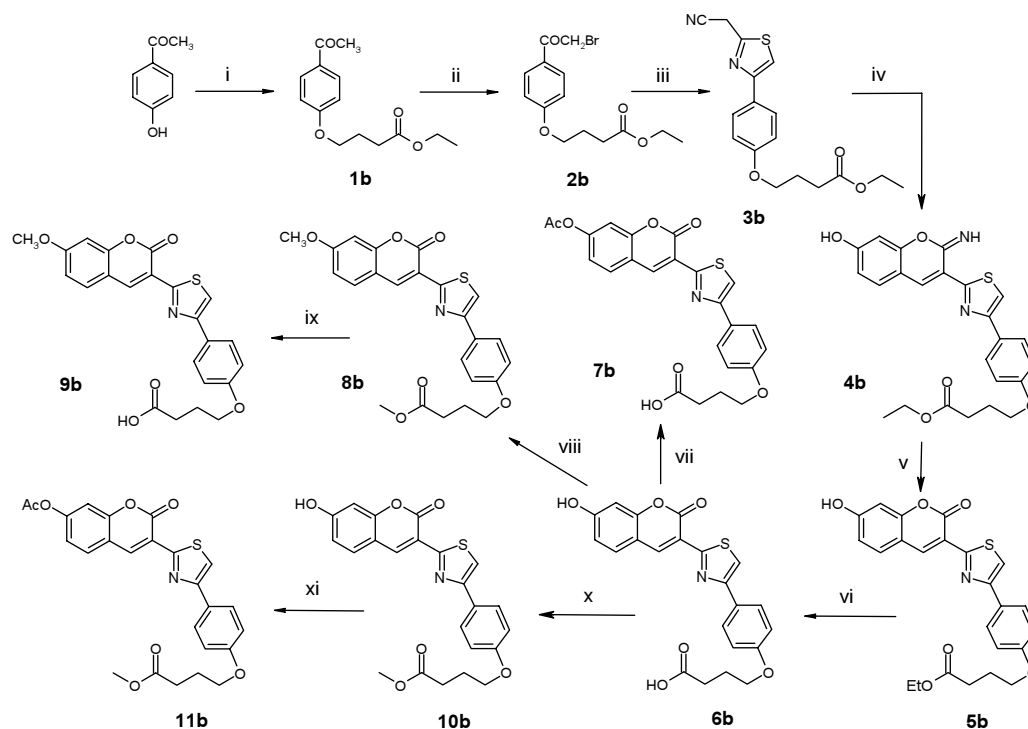
Синтез реагентів тіазольної серії. Стратегію синтезу 3-тіазолзаміщених кумаринів подано на схемі 1. Синтез сполук тіазолільного ряду почали із бромовання ацетилглутарату **1a**, яке здійснювали за методикою [20]. Основним компонентом отриманої суміші продуктів у результаті проведення декарбоксілювання в присутності конц. HCl була не бром-, а хлорацетильна похідна **2a** (за даними газової хроматографії, її вміст становив 77 %). Одержаний галогенований продукт без додаткової очистки обробляли ціангіоацетамідом в ізопропанолі протягом доби. Утворене масло без виділення ціанметилтіазолу **3a** вводили в реакцію із 2,4-дигідроксibenзальдегідом у присутності піпе-

ридину. Виявилось, що продукт **4a**, на відміну від інших компонентів реакційної суміші, не розчинний в 50%-ній оцтовій кислоті і може бути виділений таким чином. Однак під час проведення реакції конденсації в ізопропанолі частина продукту внаслідок часткової переестерифікації переходить в ізопропіловий естер. Тому проводили додаткову переестерифікацію в етанолі в умовах кислотного каталізу. Після кристалізації з етилового спирту отримали ключовий 7-гідроксикумарин **4a** у вигляді лимонно-жовтих кристалів.

Було дібрано оптимальні послідовності реакцій ацетилювання, метилювання та гідролізу, що дало змогу отримати із 7-гідроксильного інтермедіату **4a** метокси- та ацетоксипохідні тіазолілкумаринів з вільною та захищеною карбоксильною групами.

Синтез етеру **6a** проводили метилюванням інтермедіату **4a** диметилсульфатом у сухому ацетоні. Половину одержаної 7-метоксипохідної піддали гідролізу сумішню оцтової та соляної кислот у співвідношенні 1:1, одержавши кислоту **7a**. Ацилювання етилового естеру 7-гідроксикумарину **4a** проводили оцтовим ангідридом у піридині (вихід ацетоксипохідної **5a** становив 72 %). Кислоту **8a** одержали гідролізом етилового естеру 7-гідроксипохідної **4a**, який провели в суміші оцтової та соляної кис-

Синтез фенілтіазолільних похідних кумаринів



Примітки. (i). Br(CH₂)₃COOEt, Na₂CO₃, ДМФ, 154 °С; (ii). Br₂, EtOH, 40-50 °С; (iii). NCCH₂C(S)NH₂, ізопропанол; (iv). 2,4-дигідроксibenзальдегід, піперидин, ізопропанол; (v). H₂SO₄ (3 %); (vi). NaOH (3-7 %); (vii). Ac₂O, Py; (viii). Me₂SO, Na₂CO₃, ацетон; (ix). HOAc-НС 1:1; (x). MeOH, H₂SO₄; (xi). Ac₂O, Py.

лот, при цьому спостерігалось часткове ацилювання 7-гідроксильної групи (за даними ТШХ). Частина отриманого продукту **8a** проацилювали оцтовим ангідридом (3 екв) у піридині з утворенням 7-ацетокси похідної **9a** (вихід 78 %).

Синтез реагентів фенілтіазольної серії. Метод отримання кумаринових похідних цієї серії подано на схемі 2. Вихідну сполуку **1b** одержали алкілюванням *n*-гідроксиацетофенону етиловим естером 4-броммасляної кислоти в киплячому диметилформаміді з використанням поташу як основи. Реакція перебігала без значних побічних процесів і з кількісною конверсією. Бромовання ацетофенону **1b** здійснили бромом в етиловому спирті при 45-50 °С (уводили 0,8 екв Br₂, щоб уникнути утворення дибромпохідної). Отриманий карбоксиалкілмодифікований бромацетофенон **2b** містив деяку кількість (до 15 %) непробромованого вихідного ацетофенону **1b**, який, однак, не вступає в реакцію на наступному етапі, тому одержаний продукт використовували без додаткової очистки. Сполуку **2b** потрібно зберігати в

темноті, оскільки на світлі вона деградує. Продукт бромовання обробляли ціантіоацетамідом в ізопропіловому спирті протягом 50 год. Із реакційної суміші випадала суміш тіазолу **3b** і його гідроброміду. Після її обробки водним аміаком вихід вільної основи **3b** становив 56 %.

Конденсацію ціанметилтіазолу **3b** із 2,4-дигідроксibenзальдегідом проводили в ізопропанолі при 55-60 °С із використанням піперидину як основи. Вихід імінокумарину **4b** був майже кількісним (98 %). Використовуючи обмін рухливих протонів, вдалося однозначно розрізнити в ¹H ЯМР-спектрі сигнали протонів C⁴-H (8,5 м.д.) і NH (8,77 м.д.). Гідроліз іміногрупи здійснювали 3%-ною сірчаною кислотою при 60 °С, періодично опромінюючи ультразвуком, при цьому протікав і частковий гідроліз естерної групи. У процесі тестової кристалізації із піридину вдалося розділити кислоту **6b** та естер **5b** (останній випадає в осад), але у препаративних цілях одержану суміш гідролізували 3-7%-ним NaOH протягом доби з утворенням сполуки **6b**. Ця 7-гідрокси похідна кумарину з вільною карбоксильною групою була

ключовим інтермедіатом для отримання 7-метокси- та 7-ацетоксипохідних кумаринів з вільною чи естерифікованою карбоксигрупою. Як і у випадку тіазолільних похідних кумаринів, знайдено оптимальний порядок проведення реакцій метилювання, ацилювання та гідролізу, що дало змогу отримати серію кумаринових похідних **7b-11b**.

Метиловий естер 7-гідроксикумарину **10b** одержали кип'ятінням вихідної кислоти **6b** у метанолі у присутності сірчаної кислоти (вихід 82 %). Інтермедіат **8b** синтезували з виходом 61 % метилюванням 7-гідроксикумарину **6b** диметилсульфатом у сухому ацетоні. При цьому відбувалась одночасна естерифікація як гідроксильної, так і карбоксильної групи. Гідролізом його естерної групи під час кип'ятіння в суміші HOAc_r/HCl 1:1 із виходом 23 % отримали реагент **9b** із вільною карбоксильною групою. Синтез 7-ацетильованої кислоти **7b** і її метилового естеру **11b** проводили в піридині ацилюванням 7-гідроксипохідних **6b** і **10b** оцтовим ангідридом у піридині протягом ~20 год (кімнатна температура, вихід відповідно 73 і 62 %).

Виділення фенілтіазолільних похідних кумаринів під час нейтралізації кислого чи лужного розчину часто ускладнене в результаті утворення колоїдів, що, на нашу думку, є причиною низьких виходів у ряді випадків (наприклад, **9b**).

Структуру всіх отриманих препаратів серій **a** та **b** підтверджено за допомогою протонного ЯМР, а в багатьох випадках і хромато-мас-спектроскопією.

Висновки. Отже, нами отримано ряд нових реагентів для ковалентного мічення олігонуклеотидів та інших біомолекул через утворення амідного зв'язку, а саме 7-гідрокси-, 7-метокси- та 7-ацетоксипохідні 3-тіазоліл- та 3-(фенілтіазоліл)кумаринів, що містять карбоксиалкільну групу в гетарильному фрагменті. Ключовими інтермедіатами синтезів були 7-гідроксикумарини з естерифікованою COOH -групою на алкільному лінкері, з яких шляхом ацилювання, метилювання та гідролізу отримували 7-метокси- та 7-ацетоксипохідні з естерифікованою чи вільною карбоксильною групою. Отримані сполуки тіазольної серії мають інтенсивне блакитне світіння, а фенокситіазольні аналоги — лимонно-жовту флуоресценцію. Синтезовані карбокси-модифіковані барвники можуть бути ковалентно приєднані до біомолекул після активації їх COOH -групи відповідними реагентами, спектр яких достатньо широкий [21, 22]. Реагенти **7a**, **8a** та **9a** на основі 3-тіазолілкумарину вже було успішно використано для одержання кон'югатів флуоресцентних барвників із модельними олігонуклеотидами T_{10} і T_{15} [23]. Результати спектрально-флуоресцентних досліджень отриманих похідних кумаринів та їх олігонуклеотидних кон'югатів будуть опубліковані окремо. Безумовно, синтезовані карбоксиалкільні реагенти можна ковалентно приєднувати і до інших біополімерів і низькомолекулярних сполук, що містять аміногрупу.

Надійшла в редакцію 18.04.2008 р.

Synthesis of reagents based on 7-substituted 3-thiazolylcoumarins for covalent labeling of oligonucleotides

Ia.B. Kuziv¹, V.V. Ishchenko², V.P. Khilya², I.Ya. Dubey¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

² Department of Chemistry, Taras Shevchenko National University
64 Volodymyrska Str., Kyiv, 01033, Ukraine

Summary. The synthesis of carboxyl derivatives of fluorescent probes based on 7-substituted 3-thiazolylcoumarins for the attachment of the dyes to oligonucleotides and other biomolecules is described. They include 7-hydroxy-, 7-methoxy and 7-acetoxy derivatives of 3-thiazolyl- and 3-(phenylthiazolyl)coumarin. The key intermediates in the synthesis were 7-hydroxy derivatives of corresponding coumarins containing protected carboxyalkyl group. Their synthesis was performed by condensing 2,4-dihydroxybenzaldehyde with two 2-(cyanomethyl)thiazoles containing ester function on an alkyl linker. Thiazole derivatives were in turn obtained by the condensation of cyanothioacetamide with corresponding α -haloketones. 7-Methoxy and 7-acetoxy coumarin derivatives and reagents with free carboxylic group were obtained by the combination of acylation, methylation and acidic hydrolysis reactions.

Keywords: coumarins, fluorescent probes, covalent labeling, oligonucleotides conjugates.

Перелік літератури

1. Applied fluorescence in chemistry, biology and medicine (Ed. by Rettig W., Strehmel B., Schrader S., Seifert H.). — Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg, 1999. — 562 pp.
2. Wojczewski C., Stolce K., Engels J.W. Fluorescent oligonucleotides — versatile tools as probes and primers for DNA and RNA analysis // *Synlett*. — 1999. — No. 10. — P. 1667-1678.
3. Zhang P., Beck T., Tan W. Design of a molecular beacon DNA probe with two fluorophores // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2001. — Vol. 40, No. 2. — P. 402-405.
4. Houston P., Kodadek T. Spectrophotometric assay for enzyme-mediated unwinding of double-stranded DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1994. — Vol. 91, No. 12. — P. 5471-5474.
5. Ortiz E., Estrada G., Lizardi P.M. PNA molecular beacons for rapid detection of PCR amplicons // *Mol. Cell. Probes*. — 1998. — Vol. 12, No. 4. — P. 219-226.
6. Mergny J.-L., Bourtoune A.S., Garestier T., Belloc F., Rougee M., Bulychiev N.V., Koshkin A.A., Bourson J., Lebedev A.V., Valeur B., Thuong N.T., Helene C. Fluorescence energy transfer as a probe for nucleic acid structures and sequence // *Nucleic Acids Res.* — 1994. — Vol. 22, No. 6. — P. 920-928.
7. Coleman R.S., Madaras M.L. Synthesis of a novel coumarin C-riboside as a photophysical probe of oligonucleotide dynamics // *J. Org. Chem.* — 1998. — Vol. 63, No. 16. — P. 5700-5703.
8. Brauns E.B., Madaras M.L., Coleman R.S., Murphy C.J., Berg M.A. Complex local dynamics in DNA on the picosecond and nanosecond time scale // *Phys. Rev. Lett.* — 2002. — Vol. 88, No. 15. — P. 158101-1.
9. Somoza M.M., Andreatta D., Murphy C.J., Coleman R.S., Berg M.A. Effect of lesions on the dynamics of DNA on the picosecond and nanosecond timescales using a polarity sensitive probe // *Nucleic Acids Res.* — 2004. — Vol. 32, No. 8. — P. 2494-2507.
10. Sen S., Paraggio N.A., Gearheart L.A., Connor E.E., Issa A., Coleman R.S., Wilson D.M., Wyatt M.D., Berg M.A. Effect of protein binding on ultrafast DNA dynamics: Characterization of a DNA:APE1 complex // *Biophys. J.* — 2005. — Vol. 89, No. 6. — P. 4129-4138.
11. Mitsui T., Nakano H., Yamana K. Coumarin-fluorescein pair as a new donor-acceptor set for fluorescence energy transfer study of DNA // *Tetrahedron Lett.* — 2000. — Vol. 41, No. 15. — P. 2605-2608.
12. Kosiowa I., Janicova A., Kois P. Synthesis of coumarin or ferrocene labeled nucleosides via Staudinger ligation // *Beilstein J. Org. Chem.* — 2006. — Vol. 2, No. 23. — P. 1-4. <http://bjoc.beilstein-journals.org/content/2/1/23>
13. Kosiowa I., Kovackova S., Kois P. Synthesis of coumarin-nucleoside conjugates via Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition // *Tetrahedron*. — 2007. — Vol. 63, No. 2. — P. 312-320.
14. Sun W.-C., Gee K.R., Haugland R.P. Synthesis of novel fluorinated coumarins: excellent UV-light excitable fluorescent dyes // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 1998. — Vol. 8, No. 22. — P. 3107-3110.
15. Kosiowa I., Kois P. Synthesis of novel coumarin based fluorescent probes // The 10th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOS-10), 1-30 November 2006. <http://www.usc.es/congresos/ecsos/10/GOS/a027/a027.pdf>
16. Хилія О.В., Фрасинюк М.С., Туров А.В., Хилія В.П. Хімія 3-гетарилкумаринів // *ХГС*. — 2001. — Т. 8. — С. 1120-1129.
17. Белоконь Я.В., Коваленко С.Н., Силин А.В., Нукитченко В.М. Ансамбли циклов с кумариновым звеном // *ХГС*. — 1997. — Т. 10, № 10. — С. 1345-1355.
18. Khilya V.P., Shablykina O.V., Ishchenko V.V. Synthesis of hetaryl coumarins // In: Selected methods for synthesis and modification of heterocycles (Ed. by Kartsev V.G.). — Vol. 2. — IBS Press: Moscow, 2003. — P. 154-168.
19. Vernin G. General synthetic methods for thiazole and thiazolium salts // In: Thiazole and its derivatives (Ed. by Metzger J.V.). — Part 1. — John Wiley & Sons: New York, 1979. — P. 165-336.
20. Saleh M.A., Compennolle F., Van den Branden S., De Buysser W., Hoornaert G. Synthesis and 2,7-functionalization of the bicyclic lactam 2-benzyl octahydropyrido[1,2-a]pyrazin-6-one // *J. Org. Chem.* — 1993. — Vol. 58, No. 3. — P. 690-695.
21. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. — Academic Press: San Diego-New York-Boston, 1996. — 785 pp.
22. Synthesis of modified oligonucleotides and conjugates // In: Current protocols in nucleic acid chemistry (Ed. by Beaucage S.L., Bergstrom D.E., Glick G.D., Jones R.A.). — John Wiley & Sons: New York, 2003. — P. 4.0.1-4.9.28.
23. Kuziv Y., Ishchenko V., Dubey I. Synthesis of oligonucleotide-coumarin conjugates using phosphonium coupling reagent BOP // Abstract: 4th International Chemistry Conference Toulouse-Kiev. — Toulouse, France, 6-8 June 2007. — P. 61.