



(19) **UA** (11) **48 150** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 07H 21/00 A**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 97041995, 02.11.1995
(24) Дата начала действия патента: 15.08.2002
(30) Приоритет: 02.11.1994 US 08/333,895
(46) Дата публикации: 15.08.2002
(86) Заявка РСТ:
РСТ/US95/14599, 19951102

(72) Изобретатель:
Рамасами Кандасами, US,
Ванг Гуанжи, US,
Зайферт Уилфрид, US
(73) Патентовладелец:
АЙ-СИ-ЭН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ (США), US

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТ ИЛИ АМИНОСПИРТОВ, ОЛИГОНУКЛЕОТИД

(57) Реферат:

Настоящим изобретением предложены различные новые аналоги олигонуклеотидов, обладающие одним или несколькими свойствами, дающими им преимущества перед олигонуклеотидами, традиционно используемыми в процессах, где требуются олигонуклеотиды. Соединения, предложенные настоящим изобретением, - это аналоги олигонуклеотидов, в которых фуранозное кольцо, присутствующее в природной нуклеиновой кислоте, замещено аминокислотой или модифицированным аминокислотным остатком. Некоторые из этих

новых веществ, предложенных настоящим изобретением, особенно полезны для антисмыслового управления экспрессией генов. Соединения, соответствующие настоящему изобретению, могут быть использованы как гибридизационные зонды или затравки.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 8, 15.08.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** (11) **48 150** (13) **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 07H 21/00 A**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 97041995, 02.11.1995

(24) Effective date for property rights: 15.08.2002

(30) Priority: 02.11.1994 US 08/333,895

(46) Publication date: 15.08.2002

(86) PCT application:
PCT/US95/14599, 19951102

(72) Inventor:

RAMASAMY Kandasamy, US,
WANG Guangyi, US,
SEIFERT Wilfried, US

(73) Proprietor:

ICN PHARMACEUTICALS (USA), US

(54) **AMINO ACID OR AMINO ALCOHOL DERIVATIVES, OLIGONUCLEOTIDE**

(57) Abstract:

The present invention provides various novel oligonucleotide analogs having one or more properties that make the subject compounds superior to conventional oligonucleotides for use in procedures employing oligonucleotides. The compounds of the invention are oligonucleotide analogs in which the furanose ring of a naturally occurring nucleic acid is replaced with an amino acid or a modified amino alcohol residue. Some embodiments of the novel compounds of the invention are particularly useful for the antisense control of gene expression. The compounds of the invention may also be used as nucleic acid hybridization probes or as primers. Another aspect of the invention is to provide monomeric precursors of the oligonucleotide analogs of the invention. These monomeric

precursors may be used to synthesize the subject polynucleotide analogs. Another aspect of the invention is to provide formulations of the subject polynucleotide analogs that are designed for the treatment or prevention of disease conditions. Yet another aspect of the invention is to provide methods for treating or preventing diseases, particularly viral infections and cell growth disorders. The subject disease treatment methods comprise the step of administering an effective amount of the subject polynucleotide analogs for use as antisense inhibitors.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 8, 15.08.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **48 150** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 07H 21/00 A**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
97041995, 02.11.1995

(24) Дата набуття чинності: 15.08.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 02.11.1994 US 08/333,895

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.08.2002

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
PCT/US95/14599, 19951102

(72) Винахідник(и):
Рамасамі Кандасамі , US,
Ванг Гуанжі , US,
Зайферт Уілфрід , US

(73) Власник(и):
АЙ-СІ-ЕН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ (US), US

(54) ПОХІДНІ АМІНОКИСЛОТ АБО АМІНОСПИРТІВ, ОЛІГОНУКЛЕОТИД

(57) Реферат:

Даним винаходом запропоновані різні нові аналоги олігонуклеотидів, що мають одну чи декілька якостей, що надають їм перевагу перед олігонуклеотидами, традиційно використовуваних у процесах, де потрібні олігонуклеотиди. Сполуки, запропоновані у цьому винаході, - це аналоги олігонуклеотидів, у котрих фуранозне кільце, що

присутнє у природній нуклеїновій кислоті, заміщене амінокислотою або модифікованим аміноспиртовим залишком. Деякі з цих нових речовин, запропонованих цим винаходом, особливо корисні для антисмислового управління експресією генів. Сполуки, що відповідають цьому винаходу, можуть бути використаними як гібридизаційні зонди чи затравки.

Опис винаходу

Настоящее изобретение относится к аналогам полинуклеотидов, в которых отсутствуют фуранозные кольца.

Олигонуклеотиды, которые специфически связываются с комплементарными последовательностями нуклеотидов (смысловой нитью) водородными связями для подавления экспрессии генов, обычно называются антисмысловыми олигонуклеотидами. Эти синтетические олигонуклеотиды связываются с мишенью (матричной РНК), тем самым подавляя трансляцию матричной РНК. Этот антисмысловой принцип (Uhlmann, E. et al., Chem. Reviews, 1990, 90, 543 - 584; и Stein, C.A. et al., Cancer Res., 1988, 48, 2659 - 2688) используется для управления экспрессией генов в природе. Этот антисмысловой принцип был использован в лаборатории не только для подавления, но и для активации экспрессии генов. В 1978 году Zamecnik и Stephenson впервые предложили применение синтетических олигонуклеотидов в терапевтических целях (Stephenson M. L.; and Zamecnik, P. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75, 280 and 285). Специфическое подавление антисмысловых полинуклеотидов основано на специфическом спаривании по Уотсону-Крику (Watson-Crick) между гетероциклическими основаниями антисмыслового олигонуклеотида и вирусной нуклеиновой кислоты. Процесс связывания олигонуклеотидов с комплементарной нуклеиновой кислотой называется гибридизацией. Олигомер, имеющий последовательность оснований, комплементарную последовательности оснований мРНК, кодирующей белок, который необходим для прогрессирования болезни, представляет особый интерес. Специфическая гибридизация с мРНК может нарушить синтез белков, кодируемых этой мРНК.

В прошедшем десятилетии центром внимания многих исследовательских коллективов было приготовление немодифицированных олигонуклеотидов, т.е. олигонуклеотидов, имеющих структуру ДНК. В настоящее время наиболее эффективным способом приготовления фосфодиэфирных олигонуклеотидов является синтез при помощи фосфорамидитов по Карутерсу (McBride, L.J. and Caruthers, M.H., Tetrahedron Letts., 1983, 24, 245), первоначально предложенный Летсингером (Letsinger, R.L.; and Lunsford, W.B., J. Amer. Chem. Soc., 1976, 98, 3655) как способ фосфит-триэфира. Когда обычные, т.е. немодифицированные, олигонуклеотиды используются как антисмысловые олигонуклеотиды, возникают проблемы, связанные с неустойчивостью по отношению к нуклеазам и недостаточной степенью проникновения сквозь мембраны. Для того, чтобы антисмысловые олигонуклеотиды были в состоянии подавить трансляцию, необходимо, чтобы они попадали внутрь клетки в неизменном виде. Олигонуклеотид-антисмысловый ингибитор должен обладать следующими свойствами: (i) устойчивостью по отношению к вне-и внутриклеточным ферментам; (ii) способностью проникать сквозь клеточные мембраны и (iii) способностью к гибридизации с мишенью - ДНК или РНК (Agarwal, K.L. et al, Nucleic Acids Res., 1979, 6, 3009; Agarwal, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 7079). Таким образом, было бы полезно создать аналоги полинуклеотидов, свойства которых, необходимые для их использования в качестве антисмысловых единиц, затравок или гибридизационных зондов, были бы более выраженными.

В прошлом были синтезированы модифицированные полинуклеотиды; в числе модификаций - метилфосфонаты, фосфоротиоаты, различные амидаты и сахарные группы в нуклеиновых кислотах. Эти замещения в скелете обеспечивают некоторое повышение стабильности, но привносят недостаток: соединительный фосфор оказывается в положении хирального центра, что приводит к образованию 2ⁿ диастереоизомеров, где n - это число модифицированных диэфирных связей в олигомере. Присутствие множества диастереоизомеров значительно ослабляет способность модифицированного олигонуклеотида гибридизоваться с последовательностями-мишенями. Некоторые из этих замещений сохраняют также способность нести отрицательный заряд, а присутствие заряженных групп ослабляет способность соединений проникать сквозь клеточные мембраны. Эти модифицированные связи имеют еще целый ряд недостатков, определяемых природой каждой связи.

Были синтезированы некоторые аналоги олигонуклеотидов, содержащие модификации сахара. К модификациям сахара, которые использовались для создания структур, считавшихся более совершенными, особенно, структур, лучше усваиваемых клеткой, относятся α -ДНК, гомо-ДНК, морфолин- и тионуклеозиды и лептидные нуклеиновые кислоты (ПНК). Общая схема синтеза таких аналогов предусматривает вовлечение первичной гидроксильной группы нуклеозида или его нуклеотида, связанного с полимерным носителем или с 3'-нуклеотидом с атомом фосфора и определенной последовательностью, в пятивалентное или трехвалентное окисление. Некоторые из этих процедур соединения получили названия: фосфит-триэфир (фосфорамидит), фосфорный диэфир и гидрофосфонат. Промышленность производит необходимые для проведения таких процедур мономеры и связанные с полимерными носителями мономеры с защищенными основаниями (G, A, C, T, U и другими гетероциклами) и защищенными атомами фосфора, что позволяет долго хранить мономеры и предупреждает неспецифические реакции в ходе реакции соединения.

Виды нуклеиновых кислот, содержащие модифицированные сахара, неионные скелеты или нециклические полиамиды (PNA), обладают, в той или иной степени, одним или несколькими из следующих свойств, полезных для управления генами: большей дуплексной стабильностью (эффективностью гибридизации), большей специфичностью по отношению к мишени, устойчивостью по отношению к нуклеазам, хорошей усваиваемостью в клетке и способностью содействовать нуклеиновым кислотам в важных процессах (например, Н-рибонуклеазной активностью, каталитической расщепляющей активностью, способностью прекращать гибридизацию и др.). Было предложено также использовать карбонат-диэфиры. Однако, эти соединения очень неустойчивы, и карбонат-диэфирная связь не удерживает тетраэдрическую форму, свойственную фосфору в фосфодиэфирах. Подобным образом, карбаматные связи, хотя они не являются хиральными, дают треугольную

симметрию, и, как оказалось, поли-dT с такими связями не гибридизуется с поли-dA достаточно сильно (Coull, J.M. et al., Tetrahedron Letts., 1987, 28, 745; Stlrchak, E.P. et al., J. Org. Chem., 1987, 52, 4202) .

Не так давно в литературе появились сообщения о нециклических сахарных аналогах (Augustyns, K.A. et al., Nucleic Acids Res., 1991, 19, 2587 - 2593). Включение этих нециклических нуклеозидов в олигонуклеотиды привело к снижению температуры плавления, которое зависит от числа линкеров, встроенных в олигонуклеотиды. Эти олигонуклеотиды оказались устойчивыми по отношению к ферментам и спаривались основаниями с комплементарной последовательностью. С учетом недостатков, присущих полинуклеотидам и известным аналогам полинуклеотидов, было бы полезно создать новые аналоги полинуклеотидов, которые можно было бы применять в ходе антисмыслового ингибирования и других процессов, в которых используются олигомеры.

Попытки модифицировать и сахарные, и скелетные компоненты порождают продукты, которые как лекарственные средства (и в других качествах) имеют определенные недостатки. Следовательно, необходимо значительно их усовершенствовать, прежде чем будут получены эффективные средства лечения и диагностики или аналитические реактивы. Таким образом, давно назрела необходимость создать усовершенствованные олигомерные аналоги олигонуклеотидов для использования в качестве лекарственных средств.

Настоящим изобретением предложены новые олигонуклеотиды и их структурные предшественники, более устойчивые к перевариванию нуклеазами, более стабильные в физиологических условиях и способные оставаться нейтральными или нести положительный заряд, что облегчает проникновение в клетку. Кроме того, новые олигонуклеотиды, соответствующие настоящему изобретению, обладают более сильной способностью к гибридизации с нуклеиновыми кислотами-мишенями.

Олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, обычно характеризуются тем, что содержат ряд ограниченных линкеров, или мономеров, способных связываться гетероциклическими основаниями со специфичной последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени. Ограниченные линкеры, описанные в настоящем документе, при включении в олигомеры обеспечивают силу связи, часто превосходящую силу одной водородной связи, способствуя образованию конформации, компетентной к связыванию.

Нуклеомомеры, соответствующие настоящему изобретению, обычно характеризуются как группы или остатки, в которых фуранозное кольцо, присутствующее в природных нуклеотидах, замещено аминокислотой или модифицированным остатком аминспирта. Примеры мономеров и олигомеров, соответствующих настоящему изобретению, представлены формулами 1 - 41. Включение этих мономеров, описанных в настоящем документе, в олигонуклеотиды позволяет синтезировать соединения с улучшенными свойствами, к которым относятся: (i) большая липофильность, обусловленная устранением заряда, присущего фосфодиэфирным связям (Dalge, J.M. et al., Nucleic Acids Res., 1991, 19, 1805) и (ii) устойчивость к деградационному воздействию ферментов, таких как нуклеазы. Олигомеры, содержащие эти мономеры, могут быть достаточно стабильными для гибридизации с последовательностями-мишенями и по ряду свойств, превосходить немодифицированные нуклеозидные остатки.

Сущность изобретения

Настоящим изобретением предложены различные, новые аналоги олигонуклеотидов, обладающие одним или несколькими свойствами, дающими им преимущества перед олигонуклеотидами, традиционно используемыми в процессах, где применяются олигонуклеотиды. Соединения, предложенные настоящим изобретением, - это аналоги олигонуклеотидов, в которых фуранозное кольцо природной нуклеиновой кислоты замещено аминокислотой или модифицированным аминспиртовым остатком. Некоторые из новых соединений, предложенных настоящим изобретением, особенно полезны для антисмыслового управления экспрессией генов. Соединения, соответствующие настоящему изобретению, также могут быть использованы как гибридизационные зонды или как затравки.

Еще один аспект настоящего изобретения - мономерные предшественники аналогов олигонуклеотидов, соответствующих настоящему изобретению. Эти мономерные предшественники могут быть использованы для синтеза аналогов полинуклеотидов, соответствующих настоящему изобретению.

Еще один аспект настоящего изобретения - препараты аналогов полинуклеотидов, соответствующих настоящему изобретению, предназначенные для лечения или профилактики патологических состояний. Еще один аспект настоящего изобретения - способы лечения или профилактики заболеваний, в частности, вирусных инфекций и нарушений роста клеток. Способы лечения заболеваний, соответствующие настоящему изобретению, предусматривают введение эффективного количества аналогов полинуклеотидов, соответствующих настоящему изобретению, и применение их в качестве антисмысловых ингибиторов.

Краткие пояснения к иллюстративному материалу

Фиг. с 1 по 25 - это схемы химических реакций, при помощи которых можно синтезировать мономеры и олигонуклеотиды, соответствующие настоящему изобретению. В частности,

Фиг. 1 - это схема синтеза фосфорамидита тиминового мономера, соединенного с L-серинолом. Тимин и сериол соединены связью -CH₂-CO-.

Фиг. 2 - это схема синтеза фосфорамидита тиминового мономера, соединенного с L-серинолом. Тимин и сериол соединены связью -CH₂-CH₂-.

Фиг. 3 и 4 - схемы синтеза замещенных фосфорамидитов тиминового мономера, соединенного с L-серинолом. Тимин и сериол соединены связью -CH₂-CO-.

Фиг. 5 - это схема синтеза димера Т-Т, в котором нуклеотиды соединены связью в 5 атомов длиной, в центре которой находится гидроксилламин, а тимин и сериол соединены связью -CH₂-CO-.

Фиг. 6 - это схема синтеза фосфорамидита тиминового мономера, в котором тимин соединен с

N-этилгидроксиламином связью $\text{CH}_2\text{-CO-}$.

Фиг. 7 - это схема синтеза фосфорамидита тиминового мономера, соединенного с L-серинолом, в котором группа NH_2 L-серина соединена с 2-гидроксиацетиловой группой, а функциональная гидрокси-группа блокирована группой DMT (4,4'-диметокситритил). Эта строительная единица используется для соединения 2'-5'. На этой иллюстрации также представлен синтез тиминового мономера, в котором группа NH_2 L-серина соединена с 2'-гидроксиэтиловой функциональной группой.

Фиг. 8 - схема синтеза димера Т-Т, имеющего гидроксаматный скелет со связью 2'-5'. В этом димере одна строительная единица образована L-аспарагиновой кислотой и тиминном, а другая - L-серином и тиминном. В скелете этого димера присутствуют две дополнительные амидные связи.

Фиг. 9 - схема синтеза димера Т-Т, имеющего гидроксаматный скелет со связью 2'-5'. В этом димере одна строительная единица образована L-аспарагиновой кислотой и тиминном, а другая - L-серином и тиминном. В скелете этого димера амидная связь между мономерами отсутствует.

Фиг. 10 - схема синтеза фосфорамидита тиминового мономера, соединенного с L-серинол-b-аланином. Тимин и серинол связаны через посредство β -аланина.

Фиг. 11 - схема синтеза фосфорамидита тиминового мономера, соединенного с L-серинол-алкиламином. Тимин и серинол связаны через посредство алкиламина.

Фиг. 12 - схема синтеза димера Т-Т, имеющего гидроксаматный скелет со связью 4'-5'. Димер образован двумя единицами L-аспарагиновой кислоты и двумя единицами тимина; тимин и аспарагиновая кислота связаны через посредство ацетила.

Фиг. 13 - схема синтеза димера Т-Т, имеющего гидроксаматный скелет со связью 4'-5'. Димер образован двумя единицами L-аспарагиновой кислоты и двумя единицами тимина; тимин и аспарагиновая кислота связаны через посредство этила.

Фиг. 14 - схема синтеза тиминовой строительной единицы, соединенной с N-гидроксиаминокислотой.

Фиг. 15 - схема синтеза тиминовой строительной единицы, соединенной с L-аспарагиновой кислотой. Аспарагиновая кислота и тимин соединены при помощи N-гидроксиламина.

Фиг. 16 - схема синтеза димера Т-Т, имеющего гидроксаматный скелет со связью 4'-5'. Здесь карбоксильная кислотная группа соединена с тиминовой строительной единицей N-гидроксиламиновой связью.

Фиг. 17 - схема синтеза строительной единицы 150 (N-гидроксиаминокислота, замещенная тимидинуксусной кислотой) и ее аналога 149. Эти мономерные строительные единицы полезны для построения нуклеиновых кислот с гидроксаматными скелетами.

Фиг. 18 - схема синтеза гидроксиламина, замещенного тимидинуксусной кислотой, содержащего аминокислотные строительные единицы 157 и 158. Эти мономеры полезны для конструирования нуклеиновых кислот с амидными скелетами и гидроксиламиновыми функциональными группами.

Фиг. 19 - схема синтеза строительной единицы 166 (тимидин, соединенный с L-серинолом), в которой между тиминном и серинолом находится гидроксиламиновая группа. Эта строительная единица полезна для построения нуклеиновых кислот с 4'-5'-связями.

Фиг. 20 - схема синтеза тимидинового мономера 174, соединенного с глутаминовой кислотой-глицином. Эта мономерная строительная единица полезна для создания нуклеиновых кислот с амидными скелетами и связями 2'-5'.

Фиг. 21 - схема синтеза строительных единиц 181 и 182 (тимидин, соединенный с глицинолом-глицином), в которых между тиминном и глицинолом находится гидроксиламиновая группа. Эти строительные единицы полезны для приготовления нуклеиновых кислот со связями 2'-5'.

Фиг. 22 - 24 - это схемы синтеза строительных единиц 191, 199 и 207 (тимидин, соединенный с рибозоаминокислотой). Эти строительные единицы полезны для приготовления олигонуклеотидов с рибозоамидными скелетами.

Фиг. 25 - схема твердофазного синтеза олигонуклеотида 211 с рибозоамидным скелетом.

Фиг. 26 - схема синтеза 1-О-(4,4'-диметокситритил)-2-[амин(тиминилацетил)]-L-пропан-3-О-(N,N-диизопропил)- β -цианэтилфосфорамидита.

Фиг. 27 - схема синтеза 1-О-(4,4'-диметокситритил)-2-[амин(тиминилацетил)]-D-пропан-3-О-(N,N-диизопропил)- β -цианэтилфосфорамидита.

Фиг. 28 - схема синтеза 2-[(β -(4,4'-диметокситритил)-О-ацетил)амин]-3-тиминил-L-пропан-1-О-(N,N-диизопропил)- β -цианэтилфосфорамидита.

Фиг. 29 - схема синтеза N-(тиминилацетил)-N-[(2-изобутирил)окси]этил]-О-бензилгидроксиламин.

Фиг. 30 - схема синтеза (2R,4S)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-[N₃-бензоил(тимин-1-ил)]метил-4-фталимид-пирролидина.

Полное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения

А. Определения и сокращения

При описании настоящего изобретения мы будем пользоваться следующими терминами, которые определяем ниже.

В настоящем документе выражение "антисмысловая" терапия обозначает введение или выработку *in situ* олигомеров ДНК или РНК или их аналогов, специфически связывающихся с комплементарной последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени. Связывание может происходить по известному принципу комплементарности пар оснований или за счет действия других механизмов, например, в случае связывания с двухнитевыми ДНК - за счет специфических взаимодействий в большой бороздке двойной спирали. В общем,

термин "антисмысловой" относится к целому ряду технологий этой области, основанных на описанном принципе, и подходит к любому способу лечения, предусматривающему специфическое связывание с олигонуклеотидными последовательностями. Технологии антисмыслового управления генами хорошо известны специалистам в области молекулярной биологии; примеры антисмыслового управления генами можно найти, например, в патенте США 5107065, в патенте США 5166195, патенте США 5087617 и в Crooke, Annual Review Pharmacology Toxicology 1992 32; 329-376.

Термины "олигомер" и "олигонуклеотид" взаимозаменяемы и обозначают как природные соединения, такие как ДНК и РНК, так и их синтетические аналоги, в том числе соединения, предложенные настоящим изобретением. Если не указано иное, термины "олигомер" и "олигонуклеотид" обозначают и ДНК/РНК, и их синтетические аналоги. Термин "олигомер" относится к соединениям, содержащим два или более нуклеомономеров, ковалентно связанных друг с другом фосфодиэфирной связью или другой заместительной связью. Если не указано иное, термин "олигомер" не подразумевает каких-либо ограничений по длине. Так, олигомер может содержать всего два ковалентно связанных нуклеомомера (димер) или быть значительно длиннее. Олигомер может быть компетентным по связыванию, т.е. спариваться основаниями с одонитевыми и двухнитевыми последовательностями нуклеиновой кислоты. Олигомеры (например, димеры-гексамеры) также применимы в качестве синтонов для более длинных олигомеров, как описано в настоящем документе. Олигомеры могут содержать участки без оснований и псевдонуклеозиды.

К олигомерам относятся олигонуклеотиды, олигонуклеозиды, полидезоксирибонуклеотиды (содержащие 2'-дезоксид-О-рибозу или ее модифицированные формы), т.е. ДНК, полирибонуклеотиды (содержащие D-рибозу или ее модифицированные формы), т.е. РНК и полинуклеотиды любого другого типа, а это N-гликозиды или C-гликозиды пуриновых или пиримидиновых оснований. В настоящем документе под олигомерами подразумеваются также соединения, в которых соседние нуклеомомеры соединены гидроксаматными связями. Типичные для олигомеров элементы, такие как фуранозное кольцо и/или фосфодиэфирная связь, могут быть заменены любым подходящим функционально эквивалентным элементом. Под термином "олигомер" подразумевается любая структура, служащая каркасом или носителем для оснований, которая обеспечивает специфическое связывание с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени. Известные в настоящее время олигомеры можно разделить на четыре группы, характеризующиеся следующим образом: (i) олигомеры с фосфодиэфирными или аналогичными (фосфоротиоатными, метилфосфонатными и т.д.) связями, (ii) олигомеры с заместительными связями, содержащими нефосфорный центр стереоизомерии (рибоацеталь, формацеталь, карбамат и т.д.), (iii) олигомеры с морфолиновыми остатками, карбоциклическими остатками или другими фуранозными сахарами, такими как арабиноза или гексоза, вместо рибозы или дезоксирибозы и (iv) олигомеры, содержащие нуклеомомеры, связанные амидными связями, или нециклические нуклеомомеры, связанные любой подходящей заместительной связью.

Термин "нуклеомономер" в настоящем документе обозначает группу, содержащую (1) основание, ковалентно связанное с (2) второй группой. К нуклеомономерам относятся нуклеозиды, нуклеотиды или основания, связанные с аминокислотой. Нуклеомомеры можно соединять в олигомеры, которые специфически связываются с мишенью, или комплементарной последовательностью оснований нуклеиновой кислоты.

Выражение "вторая группа" обозначает здесь соединение, связанное с нуклеомономером, и относится к аминокислотной/аминоспиртовой группе; обычно это серин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, глицин и соединения, содержащие модифицированные аминокислотные группы, например, где один или несколько атомов водорода замещены другими функциональными группами (см. Формулы 24 - 41) или одна из карбоксильных групп превращена в спирт, амин, тиол, гидроксилзамин и др. Данное здесь определение нуклеомомера охватывает также основание, связанное с аминокислотой или аминокислотой и/или аналогом аминокислоты/аминоспирта, имеющим свободную карбоксильную/гидроксильную группу, и/или с их защищенными формами.

Термин "нуклеозид" в настоящем документе обозначает аминокислотное и аминспиртовое производное, содержащее, как описано ниже, пуриновые, пиримидиновые или аналогичные формы, определенные ниже, но не содержащее соединительной группы, такой как аналог фосфодиэфира или модифицированная межинуклеозидная связь. Под "5'-нуклеозидом" подразумевается нуклеозид, обеспечивающий линкеру точку соединения на атоме углерода 5'. "5'-конец линкера" соединяется с 5'-позицией нуклеозида. "3'-конец линкера" соединяется с позицией 3' следующего нуклеозида. Если имеется модифицированный нуклеозид, в котором нет 3' и/или 5'-углерода, специалисты поймут, что символы "3'" и "5'" обозначают полярность нитей по аналогии с ДНК или РНК.

Термин "нуклеозид" в настоящем документе относится к основанию, ковалентно связанному с аналогом аминокислоты/аминоспирта. Между основанием и аминокислотой/аминоспиртом содержится линкер. Под термином "нуклеозид" обычно подразумеваются рибонуклеозиды, дезоксирибонуклеозиды и любые другие нуклеозиды, являющиеся N-гликозидами или C-гликозидами оснований.

В настоящем документе термин "нуклеотид" относится к нуклеозиду, содержащему фосфатную группу или аналог фосфата (группа, в которой фосфор окислен в той же степени, что и в фосфате, например, тиофосфат, амидат).

Термин "основание" в настоящем документе обозначает разнообразные нуклеозидные основания, в том числе пуриновые и пиримидиновые гетероциклы, а также их гетероциклические аналоги и таутомеры. В число пуринов входят аденин, гуанин и ксантин; примером пуринового аналога может служить 8-оксо-N⁶-метиладенин или 7-деазаксантин. В число пиримидинов входят урацил и цитозин и их аналоги, такие как 5-метилцитозин, 5-(1-пропилиурацил), 5-(1-пропилицитозин), 5-метилурацил и 4,4-этанцитозин. Основания, присоединенные к

подходящему молекулярному каркасу, например, фосфодиэфирному скелету, способны к спариванию, которое происходит в двухнитевой ДНК или других двухнитевых нуклеиновых кислотах подобной структуры. Основания могут быть способными к спариванию и в тройных спиралях нуклеиновой кислоты.

Термин "модификация сахара" в настоящем документе обозначает любую аминокислотную или аминокислотную группу, отличную от 2'-дезоксирибозы.

Термин "аминокислота/аминоспирт" в настоящем документе обозначает любую природную аминокислоту или аминоспирт в изомерной форме R или S.

Термин "нуклеозидные связи" в настоящем документе обозначает связь, существующую внутри мономера.

Термин "связь" в настоящем документе обозначает группу, используемую для соединения основания с аминокислотой/аминоспиртом и их производными.

Термин "межнуклеотидные связи" в настоящем документе обозначает фосфодиэфирную группу (-O-P(O)(O)-O-) или любую другую функционально эквивалентную группу, ковалентно связывающую соседние нуклеомономеры.

Термин "заместительные связи" в настоящем документе обозначает любой аналог нативной группы или любую подходящую группу, ковалентно связывающую соседние нуклеомономеры. К заместительным связям относятся аналоги фосфодиэфирной группы, например, такие как фосфоротиоат и метилфосфонат, и группы, не содержащие фосфора, например, такие как амиды, гидроксаматы, гидроксилламин. К заместительным связям относятся не содержащие фосфора связи, предложенные настоящим изобретением (связи 2',5', связи 3',5', связи 4',5').

Термин "перекрестно-связывающая группа" в настоящем документе обозначает группу в олигомере, которая образует ковалентную связь с нуклеиновой кислотой-мишенью. В число перекрестно-связывающих групп входят группы, ковалентно связывающие олигомер с нуклеиновой кислотой-мишенью либо спонтанно (например, N⁴,N⁴-этанцитозин), либо под активирующим воздействием света (например, псорален) и др.

Термин "блокирующие группы" в настоящем документе обозначает заместительные группы, отличные от H, ковалентно связанные с олигомерами или нуклеомономерами в качестве протекторных групп, соединительных групп для синтеза, OPO₃-2 или других традиционных конъюгатов, таких как твердая подложка, метка, антитело, моноклональное антитело или его фрагмент и др. В настоящем документе выражение "блокирующая группа" обозначает не только протекторную группу, как в жаргонном употреблении, а относится также, например, к соединительным группам, таким как H-фосфонат или фосфорамидит.

Термин "протекторная группа" в настоящем документе относится к любой группе, способной предохранить атом O-, S или N-, к которому она присоединена, от участия в реакции или образования связи. Протекторные группы для атомов N-, входящих в основание нуклеомономера, и способы их применения известны специалистам. Примерами подходящих протекторных групп могут служить следующие, но не исключительно следующие: диизобутилформамидин, бензоил, силлил и др. Подходящими для атомов O- и S- являются, например, протекторные группы DMT, MMT, FMOC или сложные эфиры. В настоящем документе под "протекторной группой" подразумевается любая группа, способная предохранить атом O-,S- или N-, к которому она присоединена, от вступления в реакцию или образования связи. Такие протекторные группы для атомов O-,S- и N-, входящих в состав нуклеомономеров, описаны в литературе, и способы их применения известны специалистам. В число протекторных групп входят также любые группы, способные предупредить реакции и связывание на карбоксилах, тиолах и т.д.

Термин "соединительная группа" в настоящем документе обозначает любую группу, подходящую для образования связи или заместительной связи между нуклеомономерами, например, H-фосфонат и фосфорамидит.

Термин "конъюгат" или "конъюгированная группа" в настоящем документе обозначает любую группу, присоединенную к олигомеру у его окончания или на другом участке. В число конъюгатов входят твердые основы, такие как силикагель, пористое стекло и полистирол; метки, например, флуоресцентные, хемилюминесцентные, радиоактивные атомы или молекулы, ферментные группы и "репортерные" группы; средства транспорта олигомеров, такие как поликатионы, сывороточные белки, гликопротеины, полимеры и др. К конъюгатам также относятся O-холестерин, полиэтиленгликоль (PEG) (ПЭГ), аминокислоты, интеркаляторы, группы вывода полинуклеотидов, перекрестно-связывающие группы, липиды, гидроксаматы, алкилирующие агенты и др.

Термин "синтон" в настоящем документе обозначает структурную единицу в составе аналога олигонуклеотида, соответствующего настоящему изобретению.

Термин "трансфекция" в настоящем документе обозначает любой способ эффективной доставки олигомеров в клетки.

Термин "объект" в настоящем документе обозначает растение или животное, в том числе млекопитающее, в частности, человека.

Термин "производные" олигомеров и их мономерные составляющие имеет обычное для этой области значение. Например, олигонуклеотиды могут быть ковалентно связаны с различными группами, такими как интеркаляторы, соединения, взаимодействующие специфически с малой бороздкой двойной спирали ДНК, и другие произвольно взятые конъюгаты, например, метки (радиоактивные, флуоресцентные, ферментные и т.д.) Из этих добавочных групп могут быть (но не обязательно) получены производные при участии модифицированной скелетной связи; они могут стать частью собственно связи. Например, интеркаляторы, такие как акридин, могут быть связаны через R-CH₂-, присоединенный любым имеющимся -OH или SH, например, в концевой 5'-позиции РНК или ДНК, 2'-позиции РНК или ОН/SH, встроенным в 5 позиции

пиримидинов, например, вместо 5-метила в цитозине. Это производное содержит $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ в позиции 5. Может быть присоединен любой заместитель, в том числе такой, который связан обычной связью. Следовательно, указанные группы OH в олигомере, соответствующем формуле (1), могут быть

замещены фосфонатными группами, защищены стандартными протекторными группами, активированы для образования дополнительных связей с другими нуклеотидами или соединены с конъюгатами. 5'-концевой OH обычно фосфорилируют; 2'-OH или заместители OH на 3'-конце также можно фосфорилировать. Гидроксилы можно также перевести в стандартные протекторные группы.

Термин "аналог фосфодиэфира" в настоящем документе обозначает аналог обычной фосфодиэфирной связи, а также другие группы-связи. Эти другие группы включают, но не исключительно, варианты, когда O-P(O)-заменено на P(O)S, P(O)NR₂, P(O)R, P(O)OR¹, где R это H или алкил (1-7C) и R¹ -это алкил (1-7C). Аналоги фосфодиэфира в одном олигомере не обязательно должны быть идентичными; к ним предъявляется единственное требование: хотя бы одна из этих связей должна быть модифицированной межнуклеотидной связью.

"Аналогичные" формы пуринов и пиримидинов - это формы, хорошо известные специалистам, и многие из них используются в качестве химиотерапевтических средств. В неисчерпывающий перечень примеров входят 4-ацетилцитозин, 8-гидрокси-N⁶-метиладенин, азиридилилцитозин, псевдоизоцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-карбоксиметиламин метил-2-тиоурацил, 5-карбоксиметиламин метилурацил, дигидроурацил, инозин, N₆-изопентениладенин, 1-метиладенин, 1-метилпсевдоурацил, 1-метилгуанин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N₆-метиладенин, 7-метиладенин, 5-метиламин метилурацил, 5-метоксиамин метил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилгуанозин, 5'-метоксикарбонил метилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N₆-изопентениладенин, метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусная кислота, оксипутоксозин, псевдоурацил, queosine, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый эфир N-урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусная кислота, псевдоурацил, queosine, 2-тиоцитозин и 2,6-диаминопурин. Особо предпочтительным аналогом является 5-метилцитозин (в настоящем документе сокращенно обозначенный "Cme").

Термин "изостерический" в настоящем документе относится к пространственным и ориентационным свойствам межнуклеотидной связи и подразумевает и то обстоятельство, что эти свойства настолько подобны свойствам нативной фосфодиэфирной связи, что модифицированный олигонуклеотид, содержащий изостерическую связь, может заменить, заместить, имитировать нативный олигонуклеотид и/или гибридизоваться с ним.

Термин "рибозоамид" в настоящем документе обозначает межнуклеотидную связь, существующую между двумя нуклеотидными основаниями. Рибозоамидная межнуклеотидная связь содержит сочетание функциональных групп рибозы/(2'-дезоксид) и аминокислоты.

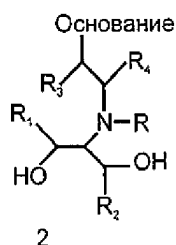
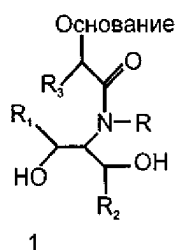
В этой заявке для обозначения функциональных групп и соединений использованы различные сокращения. Специалисты в области органической химии легко поймут эти сокращения. Например, "Ph" обозначает фенил, "Me" обозначает метил, "(1-7C)" означает, что данная цепочка содержит от 1 до 7 атомов углерода и т.д.

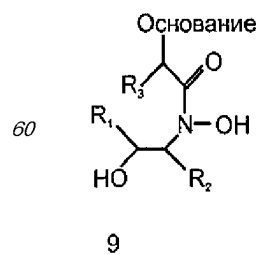
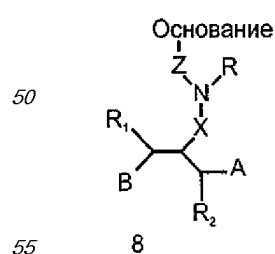
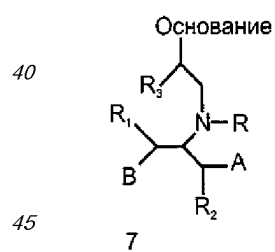
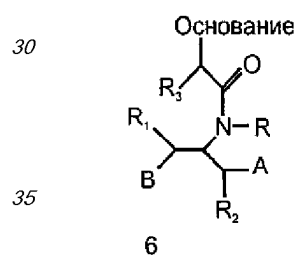
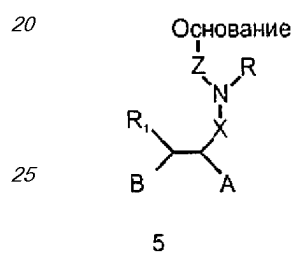
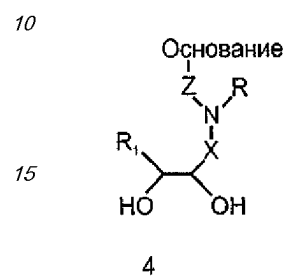
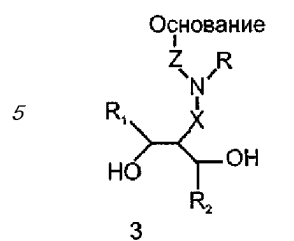
Описание изобретения

Настоящим изобретением предложены новые аналоги олигонуклеотидов, содержащие модифицированные аминокислотные/аминоспиртовые связи между основаниями и скелетами (фосфодиэфир, фосфоротиоаты и другие, приведенные в таблице 1), называемые также модифицированными нуклеотидными связями. Модификации или их функциональные эквиваленты, состоящие в замене сахарной группы, расположенной между скелетом и основанием, на производное аминокислоты, представлены, например, формулой 24.

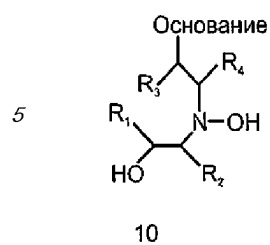
Настоящим изобретением также предложены новые нуклеомономеры и способы их включения в олигомеры, содержащие нуклеомономеры.

Настоящим изобретением предложены разнообразные нуклеомономеры со структурой, соответствующей формулам 1 - 23.

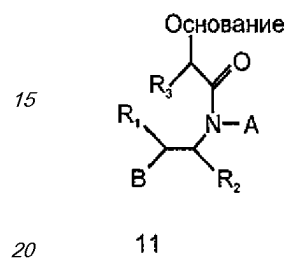




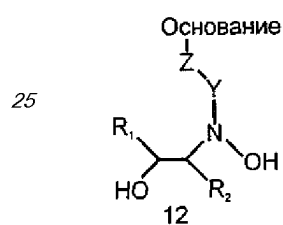
65



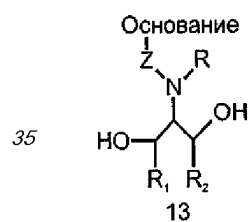
10



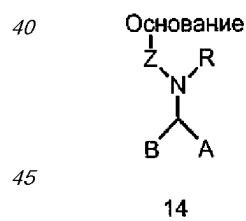
20



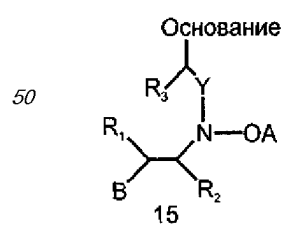
30



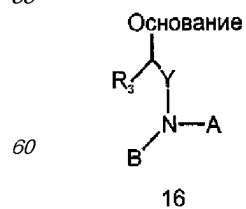
40



45

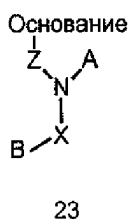
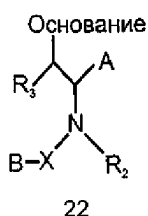
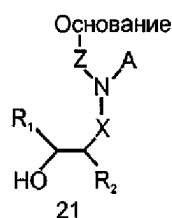
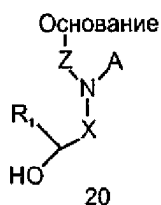
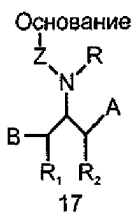


55

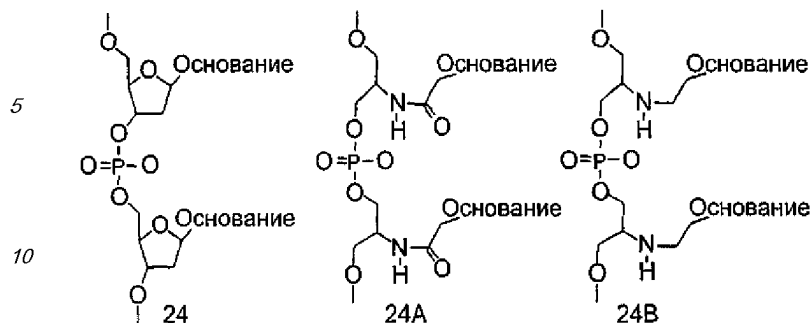


60

65

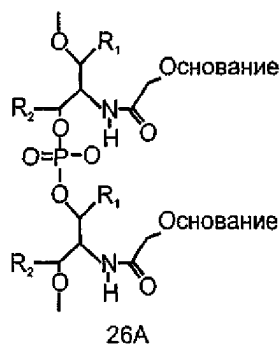
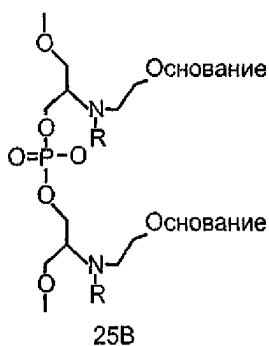
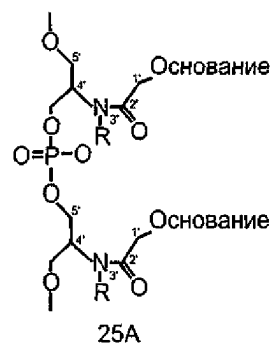


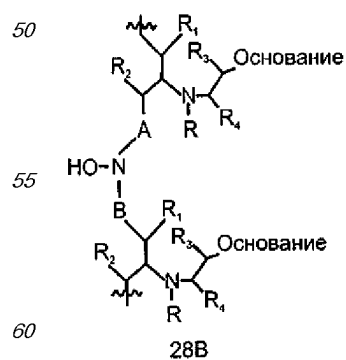
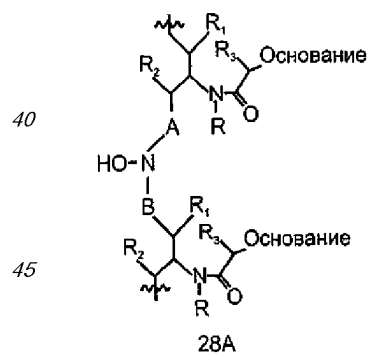
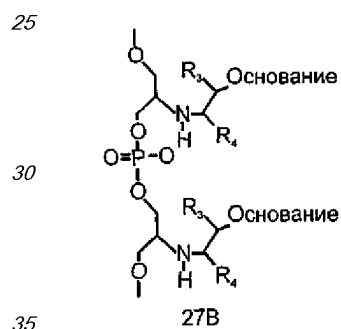
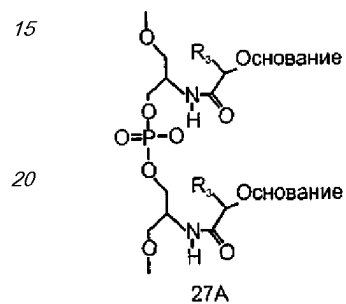
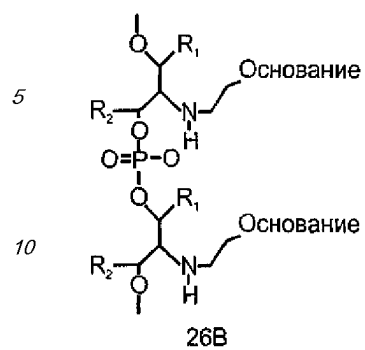
Олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, - это полимеры, содержащие одно или несколько мономерных соединений, соответствующих настоящему изобретению, связанных таким образом, чтобы получился структурный аналог ДНК или РНК. Олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, содержат два или более нуклеомонов и могут содержать практически любое количество нуклеомонов, хотя удобнее синтезировать олигомеры из 200 и менее нуклеомонов. Соединения, описанные формулами 1 - 23, можно соединять одно с другим через посредство связей 4'-5', 3'-5' и 2'-5', как видно из формул 24 - 41.



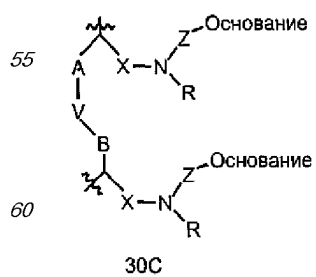
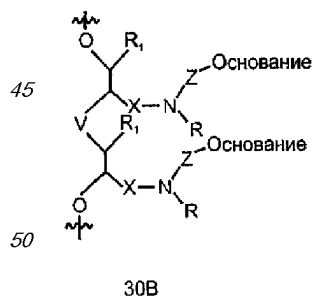
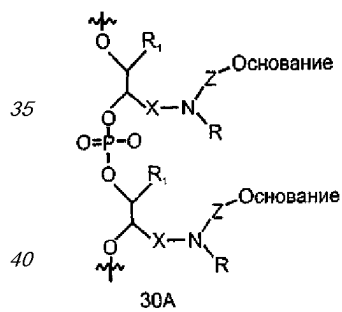
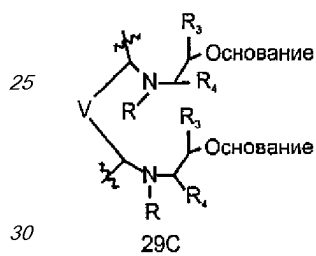
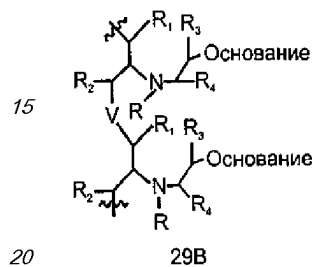
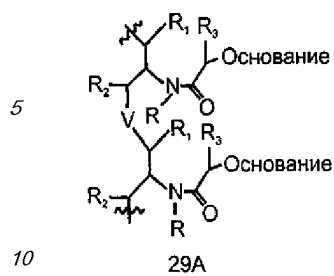
Нуклеотидные связи в соединениях, соответствующих настоящему изобретению, получены из аминокислот серина и глицина или их производных. Олигонуклеотиды, соответствующие настоящему изобретению, стабильны *in vivo*, устойчивы по отношению к воздействию эндогенных нуклеаз и способны гибридизоваться с заданными последовательностями нуклеотидов. Примеры соединений, соответствующих настоящему изобретению, представлены формулами 24 - 41. Эти соединения конформационно более ограничены по сравнению с фосфодиэфирными связями немодифицированных ДНК или РНК. Эта конформационная ограниченность может быть одной из причин усиления способности этих веществ, связываться с заданными комплементарными полинуклеотидными последовательностями; однако, применение настоящего изобретения не опирается на эту теорию усиления способности к связыванию.

В другом воплощении настоящего изобретения предложены модифицированные олигонуклеотиды или их производные, где фуранозная группа природного нуклеотида, например, ДНК или РНК, заменена аминокислотой/аминоспиртом и другими группами, в том числе аминокислотами с замещениями в определенных позициях (формулы 25 - 41). Межнуклеотидные связи между соседними нуклеомономерами - это связи между позициями 4' и 5' соседних нуклеомономеров. Иными словами, фосфодиэфирная межнуклеотидная связь или ее функциональный эквивалент соединяет 5'-позицию одного нуклеомомера с 4'-позицией другого, как в соединениях, представленных формулами 24 - 33:

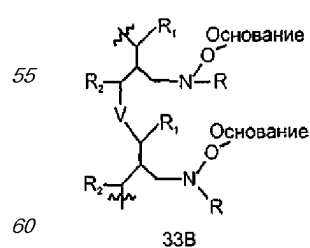
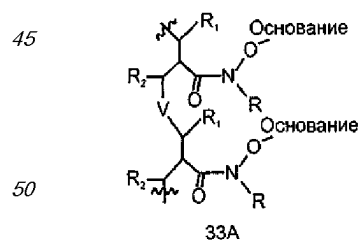
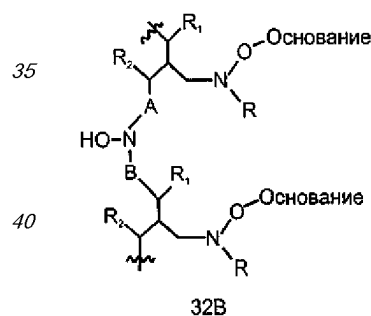
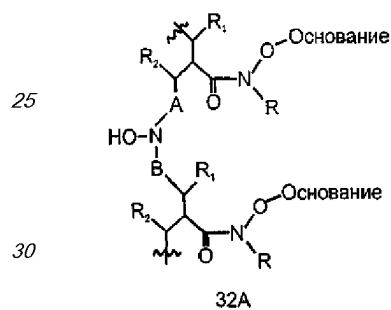
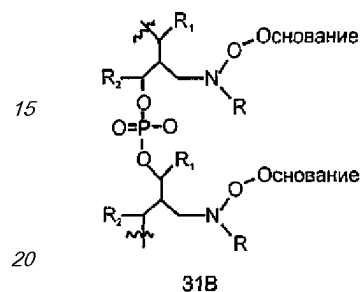
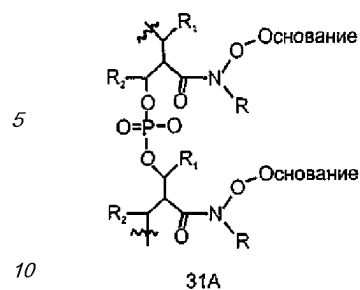




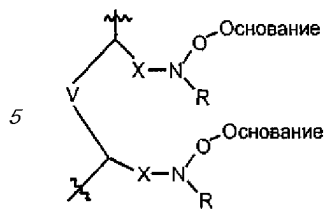
65



65



65



33C

Где каждое "R" независимо от других - это H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; где "x" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Где каждое "основание" независимо от других - это нуклеозидное основание.

Где каждое "R₁" независимо от других - это H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; где "x" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Где каждое "R₂" независимо от других - это H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; где "x" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Где каждое "R₃" независимо от других - это H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; где "x" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Где каждое "R₄" независимо от других - это H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; где "x" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Где каждое "A" независимо от других - это (CH₂)_x, CO, CS, S, 3(O), 3(O)(O), NH, NOH, NCH₃, NR₅ и Se, где "x" - это 1 - 7 атомов углерода.

Где каждое "B" независимо от других - это (CH₂)_x, CO, CS, S, 3(O), 3(O)(O), NH, NOH, NCH₃, NR₅ и Se, где "x" - это 1 - 7 атомов углерода.

Где каждое "X" независимо от других - это (CH₂)_x, CO, CS, O, S, 3(O), 5(O)(O), NH, NOH, NCH₃, и NR₅, где "x" - это 1 - 7 атомов углерода.

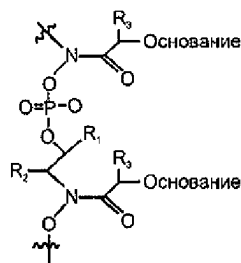
Где каждое "Z" независимо от других - это (CH₂)_x, CO, CS, S, 3(O), 3(O)(O), NH, NOH, NCH₃, и NR₅, где "x" - это 1 - 7 атомов углерода.

R₅ - это H, OH, OMe, CN, NH, NOH, ONCH₃, ONH₂, этил, пропил, низший алкил (1-7C), Me, гетероалкил (1-7C), арил(6-7C), -(CH₂)_xF; где "x" - это 1 - 7C и "F" независимо от других - это H, OH, SH, OCH₃, CN, 3CH₃, ONH₂, ONH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

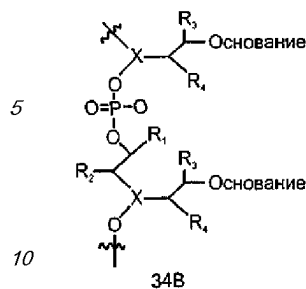
Где каждое "V" независимо от других - это аналог фосфодиэфира, фосфоротиоаты, метилфосфонаты, фосфородитиоаты, борофосфонаты, селенофосфонаты, фосфорамидаты, ацетамидат, оксиформамид, оксиацетамид, диизопропилсиллил, карбамат, диметилен сульфид, диметилен сульфоксид, диметилен сульфид и/или межнуклеозидная связь длиной в 2 - 4 атома из числа углерода, азота, кислорода, серы и селена. Олигомер может содержать от двух до двухсот мономеров, и даже больше. Предпочтительные модифицированные межнуклеотидные связи "V" приведены в Таблице 1

Кроме того, соединения, описанные этими формулами, можно связать с одной или несколькими группами-конъюгатами. В число подходящих групп-конъюгатов входят 0-холестерин, полиэтиленгликоль, аминокислоты, интеркаляторы, расщепляющие группы (например, имидазол), перекрестно-связывающие группы (например, псорален), липиды, пептиды, алкилирующие агенты, гидроксаматы и флуоресцентные метки. Группой-конъюгатом можно заместить независимо от других один из R, R₁, R₂, R₃, R₄ и R₅.

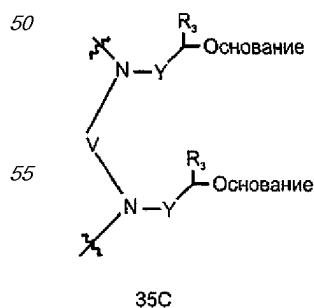
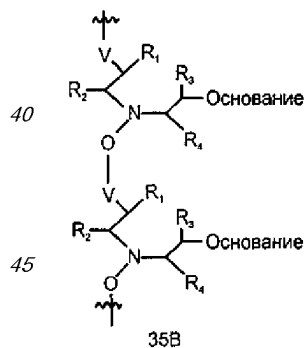
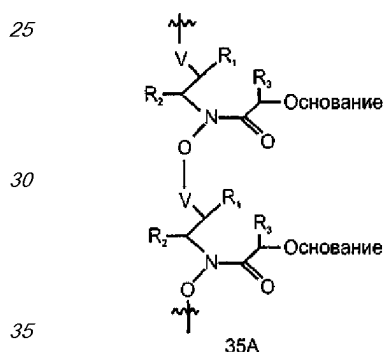
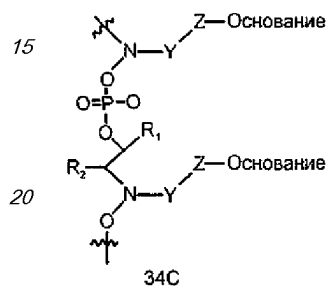
Еще один вариант осуществления настоящего изобретения - это олигомерные структуры, представленные формулами 34 - 36, и их производные:



34A



Формула 34



В соединениях, описанных формулами 34 - 36, связи между соседними нуклеомономерами - это связи 3'-5'.

Где каждое "R" независимо от других - это H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; где "x" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Где каждое "основание" независимо от других - это нуклеозидное основание.

Где каждое "R₁" независимо от других - это H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph,

$-(CH_2)_x-F$; где "x" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH_2 , SH , OH , $COOH$, OCH_3 , SCH_3 , SPh , NOH , $NOH(CH_3)$, SNH_2 , $S(O)NH_2$, $S(O)(O)NH_2$, CH_3 , Ph .

Где каждое "R₂" независимо от других - это H , OH , SH , CN , CH_3 , OCH_3 , SCH_3 , ONH_2 , $ONH(CH_3)$, Ph , $-(CH_2)_x-F$; где "x" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH_2 , SH , OH , $COOH$, OCH_3 , SCH_3 , SPh , NOH , $NOH(CH_3)$, SNH_2 , $S(O)NH_2$, $S(O)(O)NH_2$, CH_3 , Ph .

Где каждое "R₃" независимо от других - это H , OH , SH , CN , CH_3 , OCH_3 , SCH_3 , ONH_2 , $ONH(CH_3)$, Ph , $-(CH_2)_x-F$; где "x" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH_2 , SH , OH , $COOH$, OCH_3 , SCH_3 , SPh , NOH , $NOH(CH_3)$, SNH_2 , $S(O)NH_2$, $S(O)(O)NH_2$, CH_3 , Ph .

Где каждое "R₄" независимо от других H , OH , SH , CN , CH_3 , OCH_3 , SCH_3 , ONH_2 , $ONH(CH_3)$, Ph , $-(CH_2)_x-F$; где "x" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH_2 , SH , OH , $COOH$, OCH_3 , SCH_3 , SPh , NOH , $NOH(CH_3)$, SNH_2 , $S(O)NH_2$, $S(O)(O)NH_2$, CH_3 , Ph .

Где каждое "A" независимо от других - это $(CH_2)_x$, CO , CS , S , $3(O)$, $S(O)(O)$, NH , NOH , NCH_3 , NR_5 и Se , где "x" - это 1 - 7.

Где каждое "B" независимо от других - это $(CH_2)_x$, CO , CS , S , $3(O)$, $S(O)(O)$, NH , NOH , NCH_3 , NR_5 и Se , где "x" - это 1 - 7.

Где каждое "X" независимо от других - это $(CH_2)_x$, CO , CS , O , S , $3(O)$, $3(O)(O)$, NH , NOH , NCH_3 , и NR_5 , где "x" - это 1 - 7.

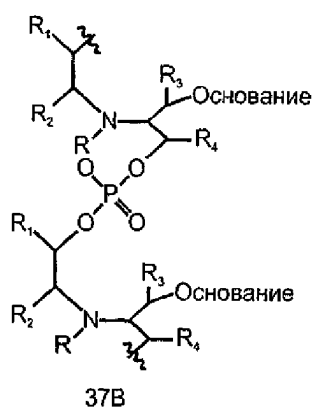
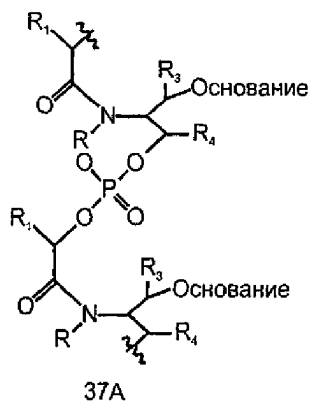
Где каждое "Y" независимо от других - это $(CH_2)_x$, CO , CS , O , S , $3(O)$, $3(O)(O)$, NH , NOH , NCH_3 и NR_5 , где "x" - это 1 - 7.

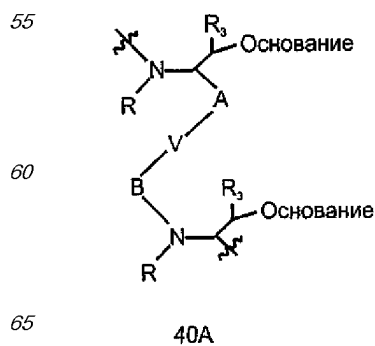
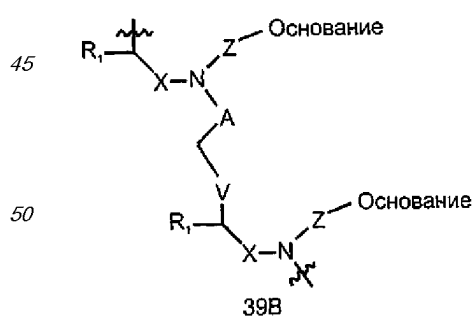
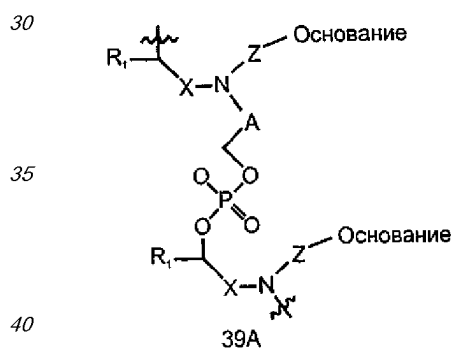
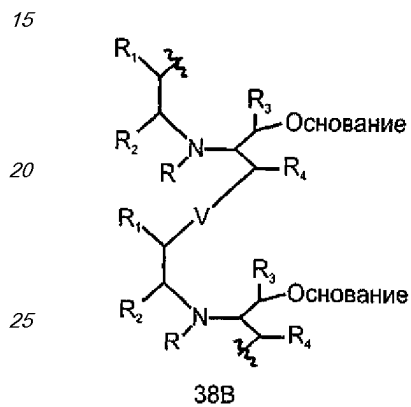
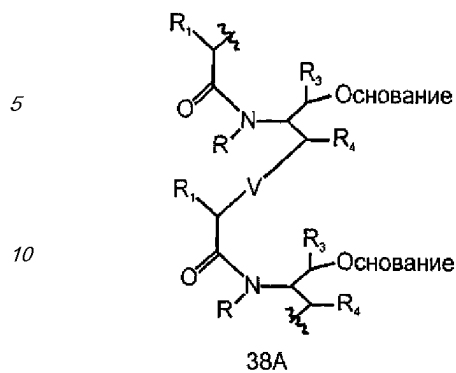
Где каждое "Z" независимо от других - это $(CH_2)_x$, CO , CS , S , $3(O)$, $3(O)(O)$, NH , NOH , NCH_3 и NR_5 , где "x" - это 1 - 7.

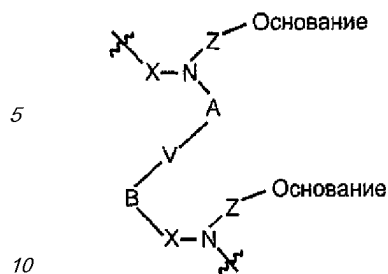
R₅ - это H , OH , OMe , CN , NH , NOH , $ONCH_3$, ONH_2 , этил, пропил, низший алкил (1-7C), Me , гетероалкил (1-7C), арил(6-7C), $-(CH_2)_x-F$; где "x" - это 1-7C и "F" независимо от других - это H , OH , SH , OCH_3 , CN , $3CH_3$, ONH_2 , $ONH(CH_3)$, SNH_2 , $S(O)NH_2$, $S(O)(O)NH_2$, CH_3 , Ph .

Где каждое "V" независимо от других - это аналог фосфодиэфира, фосфоротиоаты, метилфосфонаты, фосфородитиоаты, борофосфонаты, селенофосфонаты, фосфорамидаты, и/или межнуклеозидная связь длиной в 2 - 4 атома из числа углерода, азота, кислорода, серы и селена. Олигомер может содержать от двух до двухсот мономеров, и даже больше. Предпочтительные модифицированные межнуклеотидные связи "V" приведены в Таблице 1.

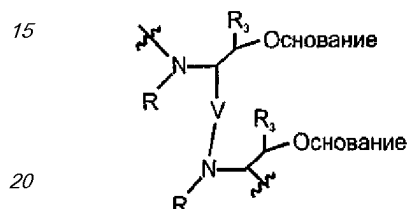
Еще один вариант осуществления настоящего изобретения - это олигомеры, соответствующие формулам 37 - 41, или их варианты. Эти олигомеры содержат новые межнуклеотидные связи - связи 2'-5'. Эти олигонуклеотиды стабильны *In vivo*, более устойчивы по отношению к воздействию эндогенных нуклеаз и способны гибридизоваться с заданными олигонуклеотидными последовательностями.



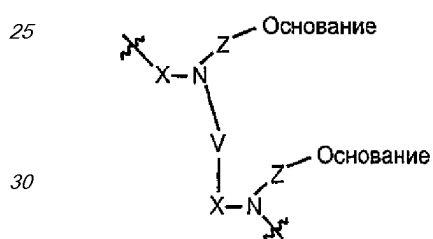




40B



41A



41B

Где каждое "R" независимо от других - это H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, OШ₂, OЫH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; где "X" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Где каждое "основание" независимо от других - это нуклеозидное основание.

Где каждое "R₁" независимо от других - это H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, 3CH₃, OШ₂, OMH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; где "X" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Где каждое "R₂" независимо от других - это H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; где "X" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Где каждое "R₃" независимо от других - это H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; где "X" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Где каждое "R₄" независимо от других H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; где "X" - это 1 - 7 атомов углерода и "F" - это NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Где каждое "A" независимо от других - это (CH₂)_x, CO, CS, S, 3(O), 3(O)(O), NH, NOH, NCH₃, NR₅ и Se, где "x" - это 1 - 7 атомов углерода.

Где каждое "B" независимо от других - это (CH₂)_x, CO, CS, S, 3(O), 3(O)(O), NH, NOH, NCH₃, NR₅ и Se, где "X" - это 1 - 7 атомов углерода.

Где каждое "X" независимо от других - это (CH₂)_x, CO, CS, O, S, 3(O), 3(O)(O), NH, NOH, NCH₃, и NR₅, где "x" - это 1 - 7 атомов углерода.

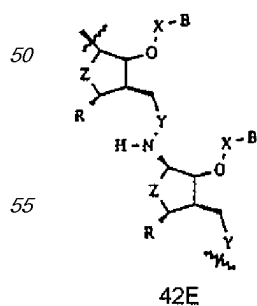
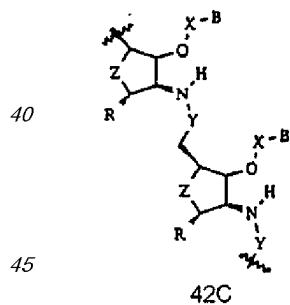
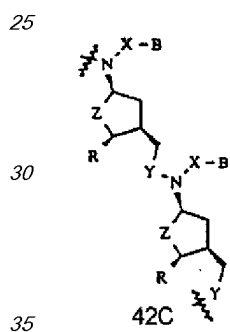
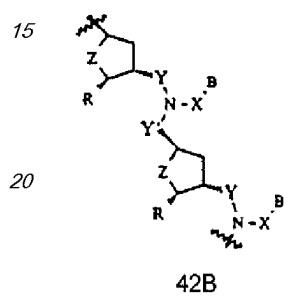
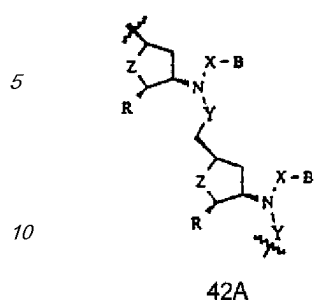
Где каждое "Z" независимо от других - это (CH₂)_x, CO, CS, S, 3(O), 3(O)(O), NH, NOH, NCH₃, и NR₅, где "x" - это 1 - 7 атомов углерода.

R₅ - это H, OH, OMe, CN, NH, NOH, ONCH₃, ONH₂, этил, пропил, низший алкил (1-7C), Me, гетероалкил (1-7C), арил(6-7C), -(CH₂)_xF; где "x" - это 1 - 7C и "F" независимо от других - это H, OH, SH, OCH₃, CN, 3CH₃, ONH₂, ONH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Где каждое "V" независимо от других - это аналог фосфодиефира, фосфоротиоаты, метилфосфонаты, фосфородитиоаты, борофосфонаты, селенофосфонаты, фосфорамидаты и/или межнуклеозидная связь длиной в 2 - 4 атома из числа углерода, азота, кислорода, серы и селена. Олигомер может содержать от двух до двухсот мономеров, и даже больше. Предпочтительные модифицированные межнуклеотидные связи "V" приведены в Таблице 1.

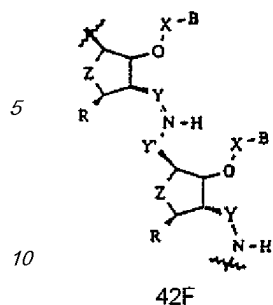
Другие варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают создание олигомера,

соответствующей следующей формуле (формула 42), и его мономерных составляющих (формулы 85 - 90).



60

65



где

X выбирают из группы, состоящей из $(CH_2)_n$, где $n = 1 - 3$, $CO(CH_2)_n$, где $n = 0 - 2$ и $(CH_2)_nSO_2$, где $n = 1 - 2$,

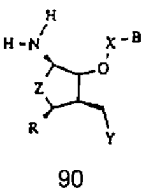
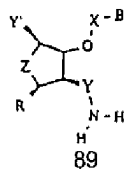
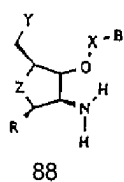
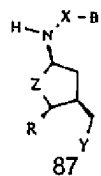
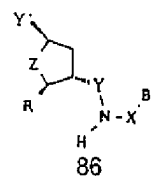
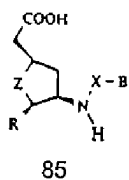
Y выбирают из группы, состоящей из CH_2 , CO, COOH, CS и SO_2 .

Y' выбирают из группы, состоящей из CH_2 , CO, COOH, CS и SO_2 .

Z выбирают из группы, состоящей из O, S, NH и CH_2 .

R выбирают из группы, состоящей из CH_2OH , CH_2NH_2 , CH_2NHCHO , $CONH_2$ и COOH.

B - это нуклеозидное основание.



где

X выбирают из группы, состоящей из $(CH_2)_n$, где $n = 1 - 3$, $CO(CH_2)_n$, где $n = 0 - 2$ и $(CH_2)_nSO_2$, где $n = 1 - 2$,

Y выбирают из группы, состоящей из CH₂, CO, COOH, CS и SO₂.

Y' выбирают из группы, состоящей из CH₂, CO, COOH, CS и SO₂.

Z выбирают из группы, состоящей из O, S, NH и CH₂.

R выбирают из группы, состоящей из CH₂OH, CH₂NH₂, CH₂NHCHO, CONH₂ и COOH.

В - это нуклеозидное основание.

Другой аспект настоящего изобретения - это способы лечения заболеваний за счет присутствия нуклеотидной последовательности, предусматривающие введение объекту, нуждающемуся в таком лечении, упомянутых выше модифицированных олигонуклеотидов, способных специфически связываться с последовательностью нуклеотидов, в количестве, необходимом для инактивации этой последовательности нуклеотидов.

В олигонуклеотидах, соответствующих настоящему изобретению, хотя бы одна из фосфодиэфирных групп, обозначенных "V" в формулах 24 - 41, замещена модифицированной межнуклеозидной связью из числа описанных в настоящем документе. Желательно заместить целый ряд фосфодиэфирных связей немодифицированного олигонуклеотида модифицированной межнуклеозидной связью; при желании это могут быть различные модифицированные межнуклеотидные связи. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения эти заместительные связи не являются хиральными, что усиливает способность олигонуклеотида гибридизоваться с заданной мишенью; однако, среди полезных соединений, соответствующих настоящему изобретению, есть и такие, в которых присутствуют хиральные связи.

Предпочтительные модифицированные межнуклеотидные связи, обозначенные в формулах "V", приведены в Таблице 1.

Таблица 1

-O-
-S-
-S(O)-
-S(O)(O)-
-Se-
-Si-
-C(O)-
-C(S)-
-NH-
-NOH-
-NCH₃-
-NR₅-
-CH₂-

5
-O-CH₂-
-CH₂-O-
-O-CH₂-CH₂-
-CH₂-CH₂-O-
-CH₂-O-CH₂-
-O-CH₂-O-
-S-CH₂-
-CH₂-S-
-S-CH₂-CH₂-
10
-CH₂-CH₂-S-
-CH₂-S-CH₂-
-S-CH₂-S-
-O-CH₂-S-
-S-CH₂-O-
-S(O)-CH₂-
15
-CH₂-S(O)-
-S(O)-CH₂-CH₂-
-CH₂-CH₂-S(O)-
-CH₂-S(O)-CH₂-
-S(O)-CH₂-S(O)-
20
-O-CH₂-S(O)-
-S(O)-CH₂-O-
-S(O)(O)-CH₂-
-CH₂-S(O)(O)-
-S(O)(O)-CH₂-CH₂-
-CH₂-CH₂-S(O)(O)-
25
-CH₂-S(O)(O)-CH₂-
-S(O)(O)-CH₂-S(O)(O)-
-O-CH₂-S(O)(O)-
-S(O)(O)-CH₂-O-
-S-S-
-S(O)-S(O)-
30
-S(O)(O)-S(O)-O-
-Se-CH₂-
-CH₂-Se-
-Se-CH₂-CH₂-
-CH₂-CH₂-Se-
-CH₂-Se-CH₂-
35
-Se-CH₂-Se-
-O-CH₂-Se-
-Se-CH₂-O-
-Se(O)-CH₂-
-CH₂-Se(O)-
40
-Se(O)-CH₂-CH₂-
-CH₂-CH₂-Se(O)-
-CH₂-Se(O)-CH₂-
-Se(O)-CH₂-Se(O)-
-O-CH₂-Se(O)-
-Se(O)-CH₂-O-
45
-Se(O)(O)-CH₂-
-CH₂-Se(O)(O)-
-Se(O)(O)-CH₂-CH₂-
-CH₂-CH₂-Se(O)(O)-
-CH₂-Se(O)(O)-CH₂-
50
-Se(O)(O)-CH₂-Se(O)(O)-
-Se-Se-

55

60

65

5 -Se (O) -Se (O) -
 -Se (O) (O) -Se (O) - (O) -
 -O-CH₂-Se (O) (O) -
 -Se (O) (O) -CH₂-O-
 -S-CH₂-Se-
 -Se-CH₂-S-
 -S (O) -CH₂-Se (O) -
 -Se (O) -CH₂-S (O) -
 10 -S (O) (O) -CH₂-Se (O) (O) -
 -Se (O) (O) -CH₂-S (O) (O) -
 -S-S-
 -S (O) -S (O) -
 -S (O) (O) -S (O) (O) -
 -Se-Se-
 -Se (O) -Se (O) -
 15 -Se (O) (O) -Se (O) (O) -
 -N (R₅) -CH₂-
 -CH₂-N (R₅) -
 -N (R₅) -CH₂-CH₂-
 -CH₂-CH₂-N (R₅) -
 -CH₂-N (R₅) -CH₂-
 20 -N (R₅) -O-
 -O-N (R₅) -
 -N (R₅) -O-CH₂-
 -CH₂-O-N (R₅) -
 -CH₂-N (R₅) -O-
 -O-N (R₅) -CH₂-
 25 -O-CH₂-N (R₅) -
 -N (R₅) -CH₂-O-
 -N (R₅) -S-
 -S-N (R₅) -
 -N (R₅) -S-CH₂-
 30 -CH₂-S-N (R₅) -
 -CH₂-N (R₅) -S-
 -S-N (R₅) -CH₂-
 -S-CH₂-N (R₅) -
 -N (R₅) -CH₂-S-
 -N (R₅) -S (O) -
 35 -S (O) -N (R₅) -
 -N (R₅) -S (O) -CH₂-
 -CH₂-S (O) -N (R₅) -
 -CH₂-N (R₅) -S (O) -
 -S (O) -N (R₅) -CH₂-
 -S (O) -CH₂-N (R₅) -
 40 -N (R₅) -CH₂-S (O) -
 -N (R₅) -S (O) (O) -
 -S (O) (O) -N (R₅) -
 -N (R₅) -S (O) (O) -CH₂-
 -CH₂-S (O) (O) -N (R₅) -
 -CH₂-N (R₅) -S (O) (O) -
 45 -S (O) (O) -N (R₅) -CH₂-
 -S (O) (O) -CH₂-N (R₅) -
 -N (R₅) -CH₂-S (O) (O) -
 -O-N (R₅) -S-
 -S-N (R₅) -O-
 50 -O-N (R₅) -S (O) -

55

60

65

5 -S (O) -N (R₅) -O-
 -O-N (R₅) -S (O) (O) -
 -S (O) (O) -N (R₅) -O-
 -O-S-O-
 -O-S (O) -O-
 -O-S (O) (O) -O-
 -N (R₅) -S-N (R₅) -
 -N (R₅) -S (O) -N (R₅) -
 10 -N (R₅) -S (O) (O) -N (R₅) -
 -CH₂-S-O-
 -CH₂-S (O) -O-
 -CH₂-S (O) (O) -O-
 -CH₂-C (O) -O-
 -CH₂-C (S) -O-
 15 -CH₂-N (R₅) -C (O) -O-
 -CH₂-N (R₅) -C (S) -O-
 -N (R₅) -C (O) -O-CH₂-
 -N (R₅) -C (S) -O-CH₂-
 -O-C (O) -N (R₅) -O-
 -O-C (S) -N (R₅) -O-
 20 -O-C (O) -N (R₅) -CH₂-
 -O-C (S) -N (R₅) -CH₂-
 -O-C (O) -CH₂-N (R₅) -
 -O-C (S) -CH₂-N (R₅) -
 -O-C (O) -CH₂-O-N (R₅) -
 -O-C (S) -CH₂-O-N (R₅) -
 25 -O-C (O) -N (R₅) -O-CH₂-
 -O-C (S) -N (R₅) -O-CH₂-
 -O-N (R₅) -C (O) -O-CH₂-
 -O-N (R₅) -C (S) -O-CH₂-
 -CH₂-O-C (O) -N (R₅) -O-
 -CH₂-O-C (S) -N (R₅) -O-
 30 -CH₂-O-C (O) -N (R₅) -CH₂-
 -CH₂-O-C (S) -N (R₅) -CH₂-
 -CH₂-O-C (O) -CH₂-N (R₅) -
 -CH₂-O-C (S) -CH₂-N (R₅) -
 -CH₂-O-C (O) -N (R₅) -
 -CH₂-O-C (S) -N (R₅) -
 35 -CH₂-O-C (O) -N (R₅) -O-
 -CH₂-O-C (S) -N (R₅) -O-
 -CH₂-O-N (R₅) -C (O) -O-
 -CH₂-O-N (R₅) -C (S) -O-
 -CH₂-N (R₅) -C (O) -S-
 -CH₂-N (R₅) -C (S) -S-
 40 -N (R₅) -C (O) -S-CH₂-
 -N (R₅) -C (S) -S-CH₂-
 -S-C (O) -N (R₅) -O-
 -O-C (S) -N (R₅) -S-
 -S-C (O) -N (R₅) -CH₂-
 -S-C (S) -N (R₅) -CH₂-
 45 -S-C (O) -CH₂-N (R₅) -
 -S-C (S) -CH₂-N (R₅) -
 -S-C (O) -CH₂-O-N (R₅) -
 -O-C (S) -CH₂-S-N (R₅) -
 -O-C (O) -N (R₅) -S-CH₂-
 50 -S-C (S) -N (R₅) -O-CH₂-

 55

 60

 65

5 -S-N(R₅)-C(O)-O-CH₂-
 -O-N(R₅)-C(S)-S-CH₂-
 -CH₂-S-C(O)-N(R₅)-O-
 -CH₂-O-C(S)-N(R₅)-S-
 -CH₂-S-C(O)-N(R₅)-CH₂-
 -CH₂-S-C(S)-N(R₅)-CH₂-
 -CH₂-S-C(O)-CH₂-N(R₅)-
 -CH₂-S-C(S)-CH₂-N(R₅)-
 10 -CH₂-S-C(O)-N(R₅)-
 -CH₂-S-C(S)-N(R₅)-
 -CH₂-S-C(O)-N(R₅)-O-
 -CH₂-S-C(S)-N(R₅)-O-
 -CH₂-S-N(R₅)-C(O)-O-
 -CH₂-S-N(R₅)-C(S)-O-
 -CH₂-O-C(O)-N(R₅)-S-
 15 -CH₂-O-C(S)-N(R₅)-S-
 -CH₂-O-N(R₅)-C(O)-S-
 -CH₂-O-N(R₅)-C(S)-S-
 -N(R₅)-N(R₅)-
 -N(R₅)-N(R₅)-CH₂-
 20 -CH₂-N(R₅)-N(R₅)-
 -N=C(NH₂)-N(R₅)-
 -N(R₅)-N=C(NH₂)-
 -S(O)-CH₂-O-
 -O-CH₂-S(O)-
 -S-CH(R₅)-O-
 25 -O-CH(R₅)-S-
 -O-CH₂-CH=CH-
 -S-CH₂-CH=CH-
 -S-CH₂-C=C-
 -N(R₅)-CH₂-N(R₅)-
 -N(R₅)-C(O)-N(R₅)-
 30 -N(R₅)-C(S)-N(R₅)-
 -N(R₅)-C(O)-S-
 -N(R₅)-C(S)-S-
 -N(R₅)-C(S)-O-
 -N(R₅)-C(O)-O-
 35 -O-C(O)-N(R₅)-
 -O-C(S)-N(R₅)-
 -S-C(O)-N(R₅)-
 -S-C(S)-N(R₅)-

R₅ - это H, OH, OMe, CN, NH, NOH, ONCH₃, ONH₂, этил, пропил, низший алкил (1-7C), Me, гетероалкил
 40 (1-7C), арил(6-7C), -(CH₂)_xF; где "x" -это 1-7C и "F" независимо от других - это H, OH, SH, OCH₃, CN, SCH₃,
 ONH₂, ONH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph. Кроме того, к связи можно присоединить одну или
 несколько групп-конъюгатов, чтобы получить олигомерный конъюгат. В число подходящих групп-конъюгатов
 45 входят О-холестерин, полиэтиленгликоль, аминокислоты, интеркаляторы, расщепляющие группы (например,
 имидазол), перекрестно-связывающие группы (например, псорален), липиды, пептиды, алкилирующие агенты,
 гидроксаматы и флуоресцентные метки.

В число особо предпочтительных связей 4' - 5' входят фосфодиэфир, фосфоротиоаты, метилфосфонаты,
 карбоксамид, тиокарбоксамид, гидроксамат, сульфонамид, гидроксилламин и карбамат. Эти же модификации
 предпочтительны и в качестве связей 2' - 5' и 3' - 5'.

Олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, не обязательно являются олигомерами с
 50 однотипными связями, они могут содержать чередующиеся или произвольно распределенные связи, в том
 числе связи типа 2', 5'. Поскольку олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, можно
 синтезировать, каждый раз добавляя по одному остатку нуклеомономера, каждую отдельную связь,
 заместительную связь и каждый отдельный заместитель типа "основание" можно подобрать независимо от
 других, чтобы получить олигонуклеотид с заданной последовательностью нуклеотидов.

55 Олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, могут содержать любое требуемое количество
 заместительных связей. Эти заместительные связи могут быть одинаковыми или различными в зависимости от
 избранного "V", кроме того, они могут быть отличными от "V", предусмотренных настоящим изобретением.
 Поскольку сборка олигомеров происходит последовательно, можно использовать любое чередование типов
 связей, заместительных связей, оснований и модификаций сахара.

60 В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения заместительные связи,
 соответствующие настоящему изобретению, чередуются регулярно. Например, за одной заместительной
 связью следуют две фосфодиэфирные связи, за которыми следует одна заместительная связь,
 соответствующая настоящему изобретению, и т.д. Кроме этого, возможно, например, такое чередование, когда
 за заместительной связью следует аналог фосфодиэфира (например, тиоат и т.д.), за которым следует
 65 заместительная связь, соответствующая настоящему изобретению, за которой следует аналог фосфодиэфира
 и т.д., т.е. в олигомере, соответствующем настоящему изобретению, могут через одну чередоваться

заместительные связи двух типов. В олигомерах, соответствующих настоящему изобретению, в которых присутствуют связи более чем одного типа, можно использовать любой регулярный порядок чередования связей различных типов, соединяющих субъединицы олигомера.

Модификацию сахара можно выполнить в одном или нескольких остатках нуклеомономеров олигомеров, соответствующих настоящему изобретению, однако, при включении таких модификаций желательно использовать нуклеотидные связи 4' - 5', 3' - 5' и 2' - 5' между остатками аминокислот. В этом случае для представления последовательности оснований аналога олигонуклеотида можно использовать дальнейшее сокращение. Например, обычные ДНК или РНК принято представлять в виде последовательности только оснований, например ATG CGC TGA. Как правило, заранее указывают, чему соответствует обозначение: ДНК или РНК. В настоящем документе для представления аналогов олигонуклеотидов с данной последовательностью оснований использована соответствующая система обозначений.

Дополнительные модификации нуклеомономеров

Олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, помимо заместительных связей, соответствующих настоящему изобретению, могут содержать различные модификации. К дополнительным модификациям относятся олигомеры, в которых (i) один или несколько нуклеомономерных остатков модифицированы в позициях 2', 3', 4' и 5', (ii) содержится одна или несколько ковалентных перекрестно-связывающих групп, (iii) присутствуют другие, не предусмотренные настоящим изобретением, связи, (iv) содержатся другие аналоги оснований, такие как 8-оксо-N⁶-метиладенин и (N) присутствуют конъюгаты, такие как интеркаляторы или полилизин, которые, соответственно, повышают аффинность связывания с последовательностями нуклеиновой кислоты-мишени или усиливают связь олигомера с клеткой.

Способность олигомеров, соответствующих настоящему изобретению, к специфическому связыванию с последовательностями в Полинуклеотидах одно- и двухнитевых мишеней совместима с дополнительными модификациями. Эти дополнительные модификации могут сообщать олигомерам и другие полезные свойства, такие как устойчивость по отношению к расщеплению нуклеазами (например, в домене олигомера, соответствующего настоящему изобретению, содержащем фосфодиэфирные связи) или повышенная способность к проникновению сквозь клеточные мембраны и т.д.

Олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, могут содержать одну или несколько заместительных связей, таких как сульфидные или сульфоновые связи (Benner, S.A., Международная публикация № WO 89/12060), сульфаматные связи (Международная публикация № WO 91/15500), карбаматные или другие заместительные связи в олигомерах с морфолиновыми связями (Stirchak, E.P. et al Nucleic Acids Res. 1989, 17, 6129 - 6141; Summerton, J., et al международная публикация № 216860) и родственные связи.

Таким образом, в число примеров олигомеров, соответствующих настоящему изобретению, входят олигомеры, в которых (1) имеется хотя бы одна заместительная связь и аминокислота, связанная с соседним мономером, (2) имеется одна или несколько заместительных связей, не относящихся к настоящему изобретению, которую выбирают из группы, включающей фосфоротиоат, метилфосфонат и тионометилфосфонат, и/или (3) имеется одна или несколько фосфодиэфирных связей и/или (4) содержатся аналоги пуринов или пиримидинов, повышающие аффинность связывания с комплементарными последовательностями-мишенями. В число других примеров входят: (1) олигомер с заместительными связями, соответствующими настоящему изобретению, на конце 3' и/или 5' и фосфоротиоатными связями в других частях олигомера; (2) олигомеры с заместительными связями, соответствующими настоящему изобретению, и стандартными пуриновыми или пиримидиновыми основаниями (например, аденином, гуанином, цитозином, тиминном или урацилом); (3) олигомеры с заместительными связями, соответствующими настоящему изобретению, и одним или несколькими основаниями, повышающими аффинность связывания или проникающую способность олигомера (например, 5-метилцитозином, 5'(1-пропинил)урацилом, 5-(1-пропинил)цитозином). В число примеров также входят олигомеры, содержащие нуклеомономерные остатки, связанные гидроксаматами.

Синтез олигомеров

Олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, можно собрать только из нуклеомономеров, соответствующих настоящему изобретению, или использовать при этом и обычные нуклеомомомеры. Синтез можно проводить в соответствии со стандартными твердофазными (или гомогенными) технологиями синтеза олигомеров, которые в настоящее время являются промышленными. В общем, синтез олигомеров, соответствующих настоящему изобретению, можно выполнить в соответствии со способом, предусматривающим синтез нуклеомомера или синтона олигомера с протекторной группой, основанием и соединительной группой, способной соединиться с нуклеомономером или олигомером; соединение нуклеомомера или синтона олигомера с нуклеомономером-акцептором или олигомером-акцептором; удаление протекторной группы; повторение цикла требуемое количество раз, пока не будет синтезирован нужный олигомер.

Олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, могут иметь любую длину, в том числе и более 40, 50, 100, 200 или 500 нуклеомономеров. В общем, предпочтительные олигомеры содержат 2 - 30 нуклеомономеров. Длины от 8 до 20 нуклеомономеров и более могут быть полезными для терапевтического и диагностического применения, при условии, что эти олигомеры имеют соответствующую последовательность оснований. Короткие олигомеры, содержащие 2, 3, 4 или 5 нуклеомономеров, включены в настоящее изобретение особо и могут быть использованы как синтоны.

Олигомеры со случайными последовательностями, содержащие 6, 7 или 8 нуклеомономеров, могут быть использованы в качестве затравок в технологиях клонирования или амплификации, в которых используются

затравки со случайными последовательностями, при условии, что олигомер содержит на 3'-конце 1 или 2 остатка, которые могут служить затравкой для полимераз или обратных транскриптаз и иным образом с полимеразой не взаимодействуют.

Помимо связей, впервые описанных в настоящем документе, олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, могут содержать обычные фосфодиэфирные связи или, помимо заместительных связей, соответствующих настоящему изобретению, могут содержать другие заместительные связи, такие как фосфорамидатные связи. В неисчерпывающий перечень этих заместительных связей входят варианты, где группа, описанная формулой $-O-P(O)(S)-O-$ ("фосфоротиоат"), $-O-P(O)(NR_2^{11})-X^2$, $-O-P(O)(R^{11})-O-$, $-O-P(S)(R^{11})-O-$ ("тиоалкилфосфонат"), $-P(O)(OR^9)-X^2$, $-O-C(O)-X^2$ или $-O-C(O)(NR_2^{11})-X^2$, где R^{11} - это H (или соль) или алкил (1 - 12 атомов углерода, в том числе метил и этил), а R - это алкил (1 - 9 атомов углерода), и связь соединены с соседними нуклеомономерами через -O- или -S-, соединенные с углеродом нуклеомономера, а X^2 - это O или S. Фосфоротиоатные и фосфодиэфирные связи хорошо известны. К заместительным связям, особенно предпочтительным для применения в олигомерах, предложенных настоящим изобретением, относятся фосфодиэфирные, фосфоротиоатные, метилфосфонатные и тиометилфосфонатные заместительные связи. Фосфоротиоатные и метилфосфонатные заместительные связи придают олигомеру большую стабильность и должны быть одинаковыми. Особо предпочтительны олигомеры, содержащие одну или несколько фосфоротиоатных или метилфосфонатных заместительных связей.

Олигомеры, предложенные настоящим изобретением, и их фрагменты можно синтезировать при помощи способов, известных специалистам. Способы синтеза, принятые в отрасли и описанные в настоящем документе, могут быть применены для синтеза олигомеров, содержащих заместительные связи, соответствующие настоящему изобретению, а также другие связи и заместительные связи, известные в отрасли, из соответствующим образом защищенных нуклеомономеров. Способы синтеза олигомеров с фосфорсодержащими связями можно найти, например, в Froehler, B., et al., *Nucleic Acids Res.*, 1986, 14, 5399 - 5467; *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16, 4831 - 4839; *Nucleosides & Nucleotides*, 1987, 6, 287 - 291; Froehler, B., *Tetrahedron Letts.*, 1986, 27, 5575 - 5578; Caruthers, M.H. в *Oligodeoxynucleotides Antisense Inhibitions of Gene Expression*, 1989. J.S.Cohen, editor, CRC Press, Boca Raton, p7 - 24; Reese, C.B. et al, *Tetrahedron Letts.*, 1985, 26, 2245 - 2248. Синтез олигомеров с метилфосфонатными связями при помощи метилфосфонамидитной химии также описан в Agrawal, S. et al., *Tetrahedron Letts.*, 1987, 28, 3539 - 3542; Klem, R.E., et al, Международная публикация № WO 92/07864).

Олигомеры, содержащие связи, предложенные настоящим изобретением, удобно синтезировать путем приготовления димерных или тримерных соединений в жидкой фазе с последующим преобразованием синтона в производное, которое включается в олигомер при помощи твердофазных или жидкофазных процедур. Типичные синтоны - это производные 3'-фосфоната или фосфорамидата, блокированные на 5'-конце при помощи DMT или MMT, приготовленные стандартными способами. (Galt, M.J. ed., *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* 1984, IRL Press, Oxford).

В число синтонов, включенных в объем настоящего изобретения, входят димеры, тримеры, тетрамеры, гексамеры и более длинные олигомеры, синтезированные в твердой или жидкой фазе. Тримеры и более длинные синтоны могут содержать связи более чем одного типа. Эти синтоны могут содержать любые основания из числа описанных выше и в позициях 2', 3', 4' и 5' могут содержать группы, такие как OH, DMTO, MMTO, O-аллил, фосфат, фосфонат или амидит, как сказано выше.

Рибозоамидные олигонуклеотиды можно синтезировать при помощи стандартной технологии твердофазного синтеза пептидов (химия Fmoc) (фиг. 26) .

Блокирующие группы для синтеза соединений, предложенных настоящим изобретением

1. Соединительные группы

К подходящим соединительным группам относятся, например, H-фосфонат, метилфосфонамидит или фосфорамидит. К подходящим фосфорамидитам относятся β -цианэтилфосфорамидиты (которые являются предпочтительными). Также можно использовать метилфосфонамидиты, алкилфосфонамидиты (в том числе этилфосфонамидиты и пропилфосфонамидиты). Примеры фосфорамидитов приведены на фиг. 1 - 21.

В число подходящих "соединительных групп" в позициях 2', 3', 4' или 5' для синтеза олигомеров по принципам химии фосфорамидит триэфира, называемым здесь "амидитной" химией, входят N,N-диизопропиламин- β -цианэтоксифосфин, N,N-диизопропиламин-метоксифосфин, N,N-диэтиламин-цианэтоксифосфин и (N-морфолин)-метоксифосфин (Moore, M.F. et al, *J Org Chem.*, 1985, 5JD, 2019-2025; Uznanski A.W., et al, *Tetrahedron Letts.*, 1987, 28, 3401 - 3404; Bjergarde, K., et al, *Nucl Acids Res.*, 1991, 19, 5843 - 5850; Dahl, O. *Sulfur Reports*, 1991, 11, 167 - 192). Для приготовления метилфосфонатов также можно использовать родственные соединительные группы, такие как N,N-диизопропиламин-метил-фосфин или N,N-диэтиламин-метил-фосфин. Метилфосфонатные олигомеры удобно синтезировать при помощи соединительных групп, таких как N,N-диизопропиламин-метилфосфорамидит. Синтез нуклеомономерных амидитов, соответствующих настоящему изобретению, можно выполнить стандартными способами (например, Gryaznov, S.M., et al, *Nucl Acids Res.*, 1992, 20, 1879 - 1882; Vlnayak, R., et al, *Nucl Acids Res.*, 1992, 20, 1265 - 1269; Sinha, N.D., et al, *Nucl Acids JRes.*, 1984, 12, 4539 - 4557 и другие ссылки, приведенные здесь).

2. Протекторные группы

Для предохранения экзоциклического азота гетероциклов цитозина, аденина или гуанина можно

использовать такие протекторные группы как диизобутилформамидин, бензоил, изобутирил, FMOC, диалкилформамидин, диалкилацетамидин или другие группы, известные специалистам. Цитидин можно непосредственно включать в олигомеры без протекторной группы на экзоциклическом азоте в соответствии с описанными способами (Gryaznov, S.M., et al, J Amer Chew. Soc., 1991, 113, 5876 - 5877; Gryaznov, S.M., et al, Nucl Acids Res., 1992, 20, 1879 - 1882; Rung, P.-P. et al, Tetrahedron Letts., 1992, 33, 5869 - 5872).

К подходящим протекторным группам относятся DMT (диметокситритил), Bz (бензоил), Ви (изобутирил), феноксиацетил, MMT (монометокситритил) или FMOC на 5'-конце и/или Н-фосфонат, метилфосфорамидит, метилфосфонамидит, β -цианэтилфосфорамидит, TBS (трет-бутилдиметилсилил) или TBDPS (трет-бутилдифенилсилил) на 3'-конце.

Предпочтительными являются протекторные группы Bz (бензоил), DMT (диметокситритил), MMT (монометокситритил) или FMOC на 5'-конце или в 5'-позиции и/или TBS, Н-фосфонат, метилфосфорамидит, метилфосфонамидит, β -цианэтилфосфорамидит на 3'-конце. Однако, при необходимости позиции блокирующих групп можно изменить (например, присоединить фосфорамидит в позиции 5', а DMT в позиции 3'). В общем, производные от олигомеров, соответствующих настоящему изобретению, и таких "блокирующих групп" можно получить известными в данной области способами, как видно из соответствующих формул.

Конъюгаты

Настоящее изобретение предусматривает и "конъюгаты" к олигомерам, соответствующим настоящему изобретению. Конъюгаты к обычным олигомерам известны специалистам. Например, олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, можно соединить ковалентной связью с различными группами, например, с интеркаляторами или соединениями, взаимодействующими специфически с малой бороздкой двойной спирали ДНК. Возможна конъюгация олигомеров и с другими группами, среди которых метки (например, радиоактивные, флуоресцентные, ферментные) или группы, облегчающие соединение с клеткой за счет присутствия в них расщепляемых линкеров, и т.д. К подходящим радиоактивным меткам относятся ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{131}I и ^{14}C ; к подходящим флуоресцентным меткам относятся флуоресцеин, резорурфин, родамин, BODIPY (Molecular Probes) и тexasский красный; к подходящим ферментным меткам относятся щелочная фосфатаза и пероксидаза из хрена. В качестве ковалентно присоединенных групп можно использовать и другие соединения: биотин, антитела или фрагменты антител, асиалогликопротеин, трансферрин и Tat-белок ВИЧ.

От этих добавочных групп можно получить производные при помощи любых подходящих групп. Например, интеркаляторы, такие как акридин и псорален, можно связать с олигомерами, соответствующими настоящему изобретению, при помощи любого имеющегося -ОН или -SH, например, в 5'-конечной позиции олигомера, 2'-позиции РНК, или через ОН, NH_2 , COOH или SH, содержащиеся в 5'-позиции пиримидинов. Удобны производные формы, содержащие, например, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ или $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, в 5 позиции пиримидинов. Конъюгаты, в числе которых полилизин или лизин, приготовляемые описанными способами, повышают аффинность связывания олигомера с заданной последовательностью нуклеиновой кислоты (Lemaltre, M. et al., Proc Natl Acad Sci. USA, 1987, 84, 648 - 652; Lemaltre, M. et al., Nucleosides & Nucleotides, 1987, 6, 311 - 315).

Можно присоединять различные заместители, в том числе те, что связаны связями или заместительными связями. Группы -ОН в олигомерах можно заместить фосфатными группами, защитить стандартными протекторными группами, соединить с соединительными группами для образования дополнительных связей с другими нуклеомономерами или связать с конъюгированным заместителем. Группу -ОН на 5'-конце можно фосфорилировать; 2'-ОН или заместители ОН на 3'-конце также могут быть фосфорилированы. От гидроксильных групп можно также получить производные при помощи стандартных протекторных групп. Олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, можно связать ковалентной связью с группами, облегчающими соединение с клеткой за счет присутствия в них расщепляемых линкеров. В число подходящих конъюгатов входят также твердые подложки для синтеза олигомеров и облегчения определения последовательности нуклеотидов в нуклеиновой кислоте. Неисчерпывающий перечень твердых подложек включает силикагель, пористое стекло, полистирол и магнитные стеклянные шарики.

Модификации сахара

Производные могут быть получены за счет замещений на сахарах. В числе предпочтительных производных олигомеров, соответствующих настоящему изобретению, 2'-О-аллил и 3'-аллил, которые увеличивают проникающую способность и устойчивость к воздействию нуклеаз, но не уменьшают аффинность олигомера к одно- или двухнитевым мишеням. В частности, в олигонуклеотиды с рибозоамидными скелетами можно вводить различные функциональные группы (в позиции 1', 2', 3', 4' и 5' рибозы) для улучшения фармакокинетических свойств соответствующих олигонуклеотидов.

Заместительные связи

Олигомеры, предложенные настоящим изобретением, помимо описанных в настоящем документе связей 2' - 5', 3' - 5' и 4' - 5', могут содержать одну или несколько "заместительных связей", известных специалистам. В число этих "заместительных связей" входят фосфоротиоат, метилфосфонат, тионометилфосфонат, фосфородитиоат, алкилфосфонаты, морфолин сульфамид, боранофосфат (-O-P (OCH_3) (BH_3)-O-), силоксан ((O-Si (X^4) (X^4)-O-); X^4 - это алкил с 1 - 6 атомами углерода или фенил) и фосфорамидат (метоксиэтиламин (-O-P ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$) (O)-O-) и т.д., которые синтезируются, как описано в общедоступной литературе, в том числе в следующих работах (Sood, A., et al J. Am. Chem. Soc., 1990, 112, 9000 - 9001; WO 91/08213; WO 90/15065; WO 91/15500; Stlrchak, E.P. et al Nucleic Acid Res., 1989, 17, 6129 - 6141; патент США 5034506, патент США 5142047; Hewltt, J.M. et al, Nucleosides & Nucleotides, 1992, 11, 1661 - 1666; Sulmerton, J et al;

Международная публикация № 216860). К заместительным связям, которые могут быть использованы в олигомерах, описанных в настоящем документе, также относятся сульфонамид ($\text{O-SO}_2\text{-NH}$), сульфид ($\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-}$), сульфонат ($\text{-O-SO}_2\text{-CH}_2\text{-}$), карбамат (O-C(O)-NH- , -NH-C(O)-O-), диметилгидразин ($\text{-CH}_2\text{-NCH}_3\text{-}$), сульфамат (-O-S(O)(O)-N- , -N-S(O)(O)-N-), 3'-амин ($\text{-NH-CH}_2\text{-}$), N-метилгидроксиламин ($\text{-CH}_2\text{-NCH}_3\text{-O-}$) и 2',5'-связи (такие как 2',5' карбамат ($2'\text{-N(H)-C(O)-O-5'}$), 5',2' карбамат ($2'\text{-O-C(O)-N(H)-5'}$), 5',2' метилкарбамат ($2'\text{-O-C(O)-N(CH}_3\text{)-5'}$) и 5',2' тиоформацеталь ($2'\text{-O-CH}_2\text{-S-5'}$). Кроме того, в качестве заместительных связей приемлемы амидные связи, описанные авторами Buchardt, O. et al, (Международная публикация № WO 92/20702), и Cook, P.O. et al (Международная публикация № WO 92/20822), De Mesmaeker, A. et al., (Международная публикация № WO 92/20823 и в PCT/US92/04294).

Если не указано иное, заместительные связи, такие как формацеталь $\text{-O-CH}_2\text{-O-}$, присоединяются к углероду 4', 3' или 2' нуклеомономера слева, а к углероду 5' нуклеомономера справа. Обозначения 4', 3', 2' или 5' можно соответствующим образом изменить, если к нуклеомономеру присоединяется структура, отличная от рибозы, дезоксирибозы или арабинозы. К таким структурам относится ксилоза, гексоза, морфолиновое кольцо, углеводородное кольцо (например, циклопентан) и др.

Применение карбаматных, карбонатных, сульфидных, сульфоксидных, сульфоновых, N-метилгидроксиламиновых и диметилгидразиновых связей в синтонах или олигомерах было описано (Vaseur, J.-J. et al, J. Amer. Chem. Soc., 1992, 114, 4006 - 4007; WO 89/12060; Muslicki, B. et al, J Org Chem., 1990, 55, 4231 - 4233; Reynolds, R.C. et al., J Org Chem., 1992, 57, 2983 - 2985; Mertes, M.P., et al J Med. Chem., 1969, 12, 154 - 157; Mungall, W.S., et al, J Org Chem., 1977, 42, 703 - 706; Stlrchak, E.P., et al, J Org Chem., 1987, 52, 4202 - 4206; Wang, H., et al, Tetrahedron Letts., 1991, 32, 7385 - 7388; Международная заявка № PCT US91/03680).

Заместительные связи включают в олигомеры для решения ряда задач: дальнейшего облегчения связывания с комплементарной последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени и/или повышения устойчивости олигомеров к воздействию нуклеаз.

Основания

В число оснований, которые можно использовать как основания нуклеотидов в соединениях, предложенных настоящим изобретением, входят не только природные пуриновые и пиримидиновые основания, но и аналоги этих гетероциклических оснований и их таутомеры. К таким аналогам относятся алкилированные пурины или пиримидины, ацилированные пурины или пиримидины или другие гетероциклы. Эти "аналогичные пуринам" или "аналогичные пиримидинам" соединения, или аналоги пуринов или пиримидинов, хорошо известны специалистам, а некоторые из них применяются в качестве лекарственных средств. Их неисчерпывающий перечень включает N^4N^4 -этанцитозин, 7-деазаксантозин, 7-деазагуанозин, 8-оксо- N^6 -метиладенин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, инозин, N^6 -изопентениладенин, 1-метиладенин, 2-метилгуанин, 5-метилцитозин, N^6 -метиладенин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-(1-пропинил)-4-тиоурацил, 5-(1-пропинил)-2-тиоурацил, 5-(1-пропинил)-2-тиоцитозин, 2-тиоцитозин и 2,6-диаминопурин. Кроме этих аналогов оснований, в олигомеры, предложенные настоящим изобретением, можно включать аналоги пиримидинов - к которым относятся 6-азацитозин, 6-азатимидин и 5-трифторметилурацил, описанные у Cook, D.P., et al, в международной публикации № WO 92/02258, включенной в настоящий документ посредством ссылки.

Включение 4-тиоуридина и 2-тиотимидина в олигомеры описано (Niklforov, T.T., et al, Tetrahedron Letts., 1992, 33, 2379 - 2382; Cllvlo, P., et al, Tetrahedron Letts., 1992, 33: 65 - 68; Niklforov, T.T., et al, Tetrahedron Letts., 1991, 32: 2505 - 2508; Xu, Y.Z., et al Tetrahedron Letts., 1991, 32: 2817 - 2820; Cllvlo, P., et al, Tetrahedron Letts., 1992, 33: 69 - 72; Connolly, B.A., et al, Nucl. Acid Res., 1989, 17, 4957 - 4974). В число предпочтительных оснований входят: аденин, гуанин, тимин, урацил, цитозин, 5-метилцитозин, 5-(1-пропинил) урацил, 5-(1-пропинил)цитозин, 8-оксо- N^6 -метиладенин, 7-деаза-7-метилгуанин, 7-деаза-7-метиладенин и 7-деазаксантозин.

Ковалентне связывающая группа

В некоторые олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, включается группа, способная образовать хотя бы одну ковалентную связь между олигомером и двойной нитью нуклеиновой кислоты. Множественные ковалентные связи могут быть образованы за счет включения ряда таких перекрестно связывающих групп. В предпочтительном случае в ковалентной связи участвует остаток основания нити мишени, но могут участвовать и другие ее фрагменты, например, сахараиды или фосфодиэферы. Функциональный характер группы, осуществляющей перекрестное связывание, определяет и ее мишень в двойной нити. В число предпочтительных перекрестно-связывающих групп входят ацилирующие и алкилирующие агенты, в частности, те, которые располагаются по отношению к части, обеспечивающей специфичность, таким образом, что не препятствуют реакции с мишенью в нити нуклеиновой кислоты.

Понятно, что гетероцикл - это не обязательно пурин или пиримидин, а псевдооснование, к которому присоединяется функциональная группа, - совсем не обязательно гетероцикл. Приемлемо любое средство присоединения функциональной группы, если ее расположение правильно.

Полярность олигомеров.

В самом общем виде символ 3'----5' обозначает олигомерную цепь, в которой все связи образованы между гидроксильной позицией 5' аминокислотного остатка нуклеомономера слева и гидроксильной позицией 3' (позиции 2'

для олигомеров со связями 2' - 5' и 4' для олигомеров со связями 4' - 5') аминокислотного остатка нуклеомономера справа (т.е., область однородной полярности), а гидроксил 5'-позиции аминокислотного остатка крайнего правого нуклеомономера остается свободным для дальнейшего связывания. Подобным образом, символ 5'----3' обозначает олигомерную цепь противоположной ориентации, где связи образованы между гидроксилом позиции 3' аминокислотного остатка левого нуклеомономера и гидроксилом позиции 5' аминокислотного остатка правого нуклеомономера, и гидроксил позиции 3' крайнего правого нуклеомономера остается свободным для дальнейшего связывания. Это верно и для олигомерных цепей 5'----4'.

Фармацевтически приемлемые соли

Настоящее изобретение предусматривает также различные соли всех соединений, описанных в настоящем документе, в том числе соли, приемлемые с фармацевтической точки зрения для введения животным и людям. Фармацевтически приемлемые соли и вещества, их образующие, хорошо известны специалистам. В предпочтительном случае это соли олигомеров, предложенных настоящим изобретением, и аммония и металлов, например, щелочных или щелочноземельных металлов: натрия, калия, магния или кальция; легко кристаллизующиеся соли аммония, полученные при реакции с аммиаком или органическими аминами, такими как моно-, ди- или три- низшие (алкил, циклоалкил или гидроксиалкил)-амиды, низшие алкилендиамины или низшие (гидроксиалкил или арилалкил)-алкиламмонийные основания, например, метиламин, диэтиламин, триэтиламин, дициклогексилламин, триэтанолламин, этилендиамин, трис-(гидроксиметил)-аминометан или бензилтриметиламмония гидроксид. Олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, могут образовывать соли и с кислотами; предпочтительно, это соли терапевтически приемлемых неорганических и органических кислот, таких как сильные неорганические кислоты, например, гидрофильные: соляная, бромистоводородная, серная, фосфорная, -алифатические или ароматические карбоновые или сульфоновые кислоты: муравьиная, уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, молочная, яблочная, винная, глюконовая, лимонная, аскорбиновая, малеиновая, фумариновая, гидроксималеиновая, пировиноградная, фенилуксусная, бензойная, 4-аминобензойная, антралиловая, 4-гидроксibenзойная, салициловая, 4-аминосалициловая, метансульфоновая, этансульфоновая, гидроксиэтансульфоновая, бензолсульфоновая, сульфаниловая или циклогексилсульфамовая и т.д.

Терапевтический эффект и применение

Поскольку олигомеры, предложенные настоящим изобретением, обладают значительной связывающей активностью по отношению к одно- и двухнуклеотидным нуклеиновым кислотам-мишеням и образуют устойчивые двойные, тройные и другие структуры с природными полинуклеотидами и их структурными аналогами, олигомеры, предложенные настоящим изобретением, могут быть использованы в большинстве процессов, в которых используются обычные олигомеры. Так, олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, могут быть использованы, например, как зонды гибридизации полинуклеотидов, затравки для полимеразной цепной реакции и подобных циклических реакций амплификации, затравки для секвенирования и др. Олигомеры, предложенные настоящим изобретением, также могут быть использованы для диагностики и лечения заболеваний. Терапевтическое применение олигомеров, соответствующих настоящему изобретению, предусматривает специфическое подавление экспрессии генов (или подавление трансляции последовательностей РНК, закодированных этими генами), связанных с возникновением и развитием патологических состояний, при помощи антисмысловых олигомеров. Олигомеры, соответствующие настоящему изобретению, могут быть использованы для опосредования антисмыслового подавления целого ряда генных мишеней. Примерами генов или РНК, закодированных этими генами, которые могут быть мишенями антисмыслового подавления при помощи олигомеров, могут служить гены/РНК, кодирующие ферменты, гормоны, сывороточные белки, трансмембранные белки, адгезионные молекулы (LFA-1, GPIIb/IIIa, ELAM-1, VACM-1, ICAM-1, E-selectin и т.д.), молекулы рецепторов, в том числе цитокиновых рецепторов, цитокины (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 и др.), онкогены, факторы роста и интерлейкины. Эти гены или РНК могут быть связаны с любыми патологическими состояниями, вызванными воспалением, сердечно-сосудистыми заболеваниями, иммунными реакциями, раком, вирусными инфекциями, бактериальными инфекциями, грибковыми инфекциями, паразитарными инвазиями и др.

Олигомеры, предложенные настоящим изобретением, пригодны для терапевтического применения как *In vivo*, так и *ex vivo*. К показаниям для применения *ex vivo* относится необходимость обработки клеток, таких как костный мозг или периферийная кровь, при таких состояниях как лейкоз (хронический миелолейкоз, острый лимфолейкоз) или вирусная инфекция. К генам или РНК, кодируемым этими генами, которые могут служить мишенями при лечении рака, относятся онкогены, такие как *ras*, *bcl-2*, *c-myc*, *bcr*, *c-myc*, *c-abl*, или сверхсинтезированные последовательности, такие как *mdm2*, онкостатин М, IL-6 (саркома Капоши), HER-2, и транслокации, такие как *bcr-abl*. Подходящими мишенями являются также вирусные генные последовательности или РНК, закодированные соответствующими генами, такие как гены полимераз или обратных транскриптаз герпетических вирусов, таких как цитомегаловирус и вирусы простого герпеса 1 и 2; ретровирусов, таких как вирус человеческого Т-клеточного лейкоза-1, ВИЧ-1, ВИЧ-2; или других ДНК-или РНК-вирусов, таких как HBV, HPV, VZV, вирус гриппа, аденовирусы, флавивирусы, риновирус и др.

Специфически связывающиеся олигомеры могут быть использованы в сочетании с другими терапевтическими средствами. К другим областям терапевтического применения олигомеров, предложенных настоящим изобретением, относятся (1) модуляция воспалительных реакций за счет модуляции экспрессии генов, таких как гены рецептора IL-1, IL-1, ICAM или E-Selectin, которые играют определенную роль в опосредовании воспаления (2) модуляция пролиферации клеток в таких состояниях как закупорка артерии (рестеноз) после ангиопластики за счет модуляции экспрессии (а) факторов роста или деления клеток, таких как

немышечный миозин, тус, fox, PCNA, PDGF или FGF или их рецепторов или (b) факторов пролиферации клеток, таких как с-туб. При лечении псориаза и других состояний мишенями могут служить другие факторы пролиферации или факторы передачи сигналов, такие как TGF α , IL-6, glnF, протеин киназа C, тирозин киназы (такие как p210 и p190). Кроме того, при аутоиммунных заболеваниях мишенями могут служить аллели главного комплекса гистосовместимости, TGF α или рецептора EGF.

Эффективность доставки олигомеров, предложенных настоящим изобретением, в клетки можно повысить любым подходящим способом, в том числе путем трансфекции при помощи фосфата кальция, диметилсульфоксида, глицерина или декстрана, путем электропорации или при помощи катионных, анионных и/или нейтральных липидных соединений или липосом, как описано в международных публикациях № WO 90/14074, WO 91/16024, WO 91/17424 и в патенте США 4897355. Олигомеры можно вводить в клетки в виде комплексов с катионными липидами, такими как DOTMA (которые могут образовывать липосомы или не образовывать их); введенный комплекс затем взаимодействует с клеткой. В неисчерпывающий перечень приемлемых катионных липидов входят N-(2,3-ди(9-(Z)-октадеценилоксил))-проп-1-ил-N,N,N-триметиламмоний (DOTMA) и его соли, 1-О-олеил-2-О-олеил-3-диметиламинопропил- β -гидроксиэтиламмоний и его соли и 2,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан и его соли. Повысить эффективность доставки олигомеров, предложенных настоящим изобретением, можно также при помощи (i) вирусов, таких как вирус Сендай (Bartzatt, R., *Biotechnol Appl Blochem.*, 1989, 11, 133 - 135) или аденовирус (Wagner, E. et al, *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1992, 89, 6099 - 6013); (II) полиаминных или поликатионных конъюгатов, таких как полилизин, протамин или Na, NI2~6nc(этил)спермин (Wagner, E. et al, *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1991, 88, 4255 - 4259; Zenke, M., et al, *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1990, 87, 3655 - 3659; Chank, B.K., et al, *Biochem Blophys Res Commun.*, 1988, 157, 264 - 270; Патент США 5138045); (III) липополиаминных комплексов с такими соединениями, как липоспермин (Behr, J.-P. et al, *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1989, 86, 6982 - 6986; Loeffler, J.P., et al, *J. Neurochem.*, 1990, 54, 1812 - 1815); (iv) анионных, нейтральных или чувствительных к pH липидов, с использованием соединений, в число которых входят анионные фосфолипиды, такие как фосфатидилглицерин, кардиолипин, фосфатидная кислота или фосфатидилэтаноламин (Lee, K.-D. et al, *Biochem Blophys ACTA*, 1992, 1103, 185 - 197; Cheddar, G. et al, *Arch Blochem Blophys*, 1992, 294, 188 - 192; Yoshimura, T., et al, *Biochem Int.*, 1990, 20, 697 - 706); (N) конъюгации с такими соединениями, как трансферрин или биотин, или (vi) конъюгации с белками (в том числе альбумином или антителами), гликопротеинами или полимерами (в том числе, полиэтиленгликолем), которые улучшают фармакокинетические свойства олигомеров, о которых идет речь. В настоящем документе под трансфекцией подразумевается любой способ, приемлемый для доставки олигомеров в клетки. Любое вещество, такое как липид, или любой агент, такой как вирус, который может быть использован для осуществления трансфекции, в общем случае мы будем называть "агентом, повышающим проникающую способность". Доставка олигомеров в клетки может быть осуществлена посредством котрансфекции с другими нуклеиновыми кислотами, такими как (i) экспрессируемые фрагменты ДНК, кодирующие белок/белки или фрагмент белка, или (ii) транскрибируемые РНК, кодирующие белок/белки или фрагменты белка.

Таким образом, олигомеры, предложенные настоящим изобретением, могут быть включены в любой подходящий состав, повышающий эффективность их доставки в клетки. К подходящим фармацевтическим составам относятся также те, которые обычно используются, когда доставка соединения в клетки или ткани происходит за счет наружного применения состава. В препаратах для наружного применения, содержащих олигомеры, могут быть использованы такие соединения как полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, азон, ноноксил-9, олеиновая кислота, диметилсульфоксид, полиамины или липополиамины.

Олигомеры, предложенные настоящим изобретением, удобно использовать как реактивы для анализа или приготовления соединений, когда необходимо подавление экспрессии генов. В настоящее время существует очень немного реактивов, которые за счет какого-либо механизма эффективно и специфично подавляли бы экспрессию заданного гена. Олигомеры, о которых сообщали, что они подавляют экспрессию заданного гена, часто давали неспецифические эффекты и/или не подавляли экспрессию заданного гена в достаточной степени (до менее, чем 40% от неингибированного уровня).

Таким образом, олигомеры, описанные в настоящем документе, представляют собой реактивы, которые можно использовать для подавления экспрессии определенного белка или белков в организме-объекте или в клетках, где белки кодируются последовательностями ДНК и транскрибируются с последовательностей РНК, в соответствии со способами, предусматривающими: введение олигомера, соответствующего настоящему изобретению, в клетки; создание условий, при которых олигомер образует двойную или тройную структуру с ДНК или РНК и тем самым подавляет экспрессию белка или белков. Способы и соединения, предложенные настоящим изобретением, пригодны для модуляции экспрессии генов и в прокариотических, и в эукариотических клетках, таких как бактериальные клетки, клетки грибковых паразитов, дрожжи и клетки млекопитающих.

Использование заместительных связей, предложенных настоящим изобретением, позволяет легко конструировать олигомеры, "компетентные" и "некомпетентные" по отношению к рибонуклеазе Н. Компетентные по отношению к рибонуклеазе Н олигомеры могут содержать один или несколько компетентных по отношению к рибонуклеазе Н доменов, состоящих из связанных друг с другом нуклеомономеров, компетентных по отношению к рибонуклеазе Н. Олигомеры, содержащие модификации, такие как 2'-замещения (2'-О-аллил и т.д.) или незаряженные связи (метилфосфонат, фосфорамидат и т.п.), обычно некомпетентны как субстрат для рибонуклеазы Н, который бы она распознавала и на который бы воздействовала. Компетентность по отношению к рибонуклеазе Н может усилить антисмысловое действие олигомера за счет деградации РНК-мишени в

структуре РНК-олигомер (Dagle, J.M. et al, Nucl Acids Res., 1990, 18, 4751 - 4757; Walder, J.A. et al, Международная публикация № WO 89/05358). Фермент расщепляет РНК в двойных структурах РНК-ДНК.

Для сохранения компетенции по отношению к рибонуклеазе Н необходимо, чтобы в олигомере содержался компетентный по отношению к рибонуклеазе Н домен, состоящий из трех или более связанных друг с другом компетентных нуклеомономеров (Quartln, R.S., et al, Nucl Acids Res., 1989, 17, 7253 - 7262). В структуре олигомеров, устойчивых к перевариванию нуклеазами, должны присутствовать концевые связи и модификации Сахаров и/или оснований, обеспечивающие устойчивость к нуклеазам. Так, можно сконструировать олигомеры, содержащие модифицированные нуклеомономерные остатки на одном из концов 5' или 3' или на обоих концах и компетентный по отношению к рибонуклеазе Н домен в середине. Примерами олигомеров, у которых сохранилась компетенция по отношению к рибонуклеазе Н, как правило, служат олигомеры с однородной полярностью и 2 - 12 нуклеомономерами на 5'-конце и на 3'-конце, придающими им устойчивость по отношению к воздействию нуклеаз, и 3 - 26 нуклеомономерами, образующими компетентный по отношению к рибонуклеазе Н домен и расположенными между некомпетентными в отношении рибонуклеазы Н концами 3' и 5'. Возможны разновидности таких олигомеров, содержащие (1) более короткий компетентный в отношении рибонуклеазы Н домен, содержащий 1 - 2 компетентные в отношении рибонуклеазы Н связи или заместительные связи, (2) более длинный некомпетентный в отношении рибонуклеазы Н домен, содержащий 1 - 20 и более заместительных связей или нуклеомономеров, (3) более длинный компетентный в отношении рибонуклеазы Н домен, содержащий 30 - 40 и более связей, (4) единственный некомпетентный в отношении рибонуклеазы Н домен на конце 3' или на конце 5'.

Олигомеры, содержащие до 8 нуклеомономеров, могут быть использованы для подавления экспрессии заданного белка (белков) за счет их способности образовывать двойные или тройные структуры с заданными последовательностями нуклеиновых кислот. Однако, в предпочтительном случае линейные олигомеры, используемые для подавления экспрессии заданного белка за счет образования двойных или тройных структур, должны содержать от 10 до 20 нуклеомономерных остатков.

Олигомерам, содержащим заместительные связи, предложенные настоящим изобретением, можно придать кольцевую форму, как описано в (Международная публикация № WO 92/19732; KOO'i, E.T. J Am Chem Soc., 1991, 113, 6265 - 6266; Prakash, G. et al, J Am Chem Soc., 1992, 114, 3523 - 3527). Такие олигомеры пригодны для связывания с одонитевыми или двухнитевыми нуклеиновыми кислотами-мишенями. Размеры закольцованных олигомеров могут быть различными. Можно приготовить такие олигомеры длиной в 22 - 50 нуклеомономеров. Кольцевые олигомеры могут содержать в области замыкания кольца от трех до шести нуклеомономерных остатков, разделяющих связывающие домены олигомера, как описано у (Prakash, там же). Закольцевать олигомеры можно при помощи ферментов (воздействовать лигазой на окончательный фосфат) или химически - за счет связывания 5'- и 3'- конечных Сахаров и/или оснований.

Олигомеры могут быть использованы для модуляции экспрессии заданных генов как ингибиторы взаимодействия белков, связывающихся с нуклеиновыми кислотами и ответственных за управление транскрипцией (Maher, L.J., et al, Science, 1989, 245, 725 - 730) или трансляцией. Таким образом, олигомеры приемлемы в качестве агентов, специфичных по отношению к последовательности, конкурирующих с белками, связывающими нуклеиновые кислоты (в том числе, рибосомами, РНК полимеразы, ДНК полимеразы, инициаторами трансляции, факторами, ускоряющими или подавляющими транскрипцию, белково-гормональными факторами транскрипции и т.п.)□ Следовательно, соответствующим образом сконструированные олигомеры могут быть использованы для усиления синтеза заданного белка за счет связывания управляющего участка (или его окрестности), который факторы транскрипции используют для подавления экспрессии, или за счет подавления экспрессии самого белка-репрессора.

Олигомеры, предложенные настоящим изобретением и содержащие дополнительные модификации, которые повышают аффинность связывания, могут быть сконструированы так, что в них будут входить вторичные или третичные структуры, такие как псевдоузлы или псевдополуузлы (Ecker, D.J. et al, Science, 1992, 257, 958 - 961). Такие структуры могут иметь более устойчивую вторичную или третичную структуру, чем соответствующие немодифицированные олигомеры. Повышенная устойчивость таких структур объясняется повышением аффинности связывания между комплементарными участками одного олигомера или комплементарными участками двух и более олигомеров, образующих данную структуру. Такие структуры могут быть использованы для имитации структур, таких как структура ТАК вируса иммунодефицита человека, чтобы помешать ее связыванию с Tat-белком ВИЧ (белок, связывающийся с ТАК). Подобный подход можно применить к другим транскрипционным или трансляционным факторам, распознающим высшие структуры нуклеиновых кислот, такие как стволы, петли, шпильки, узлы и т.п. Кроме того, олигомеры, предложенные настоящим изобретением, могут быть использованы для: (1) разрушения или (2) связывания таких структур, чтобы (1) препятствовать или (2) способствовать связыванию белков со структурами нуклеиновых кислот. Олигомеры, предложенные настоящим изобретением, могут быть использованы не только как средства антисмысловой или трехспиральной терапии, но и как лечебные и диагностические средства, действующие за счет непосредственного вытеснения одной из нитей двухнитевой нуклеиновой кислоты. Вытеснить одну из нитей природной двухнитевой нуклеиновой кислоты, такой как хромосомная ДНК или двойная вирусная ДНК, РНК или гибрид РНК/ДНК могут олигомеры с высокой аффинностью связывания, так как комплементарная им последовательность недостаточно велика для эффективного вытеснения нити ДНК или РНК из двойной структуры. Терапевтическая эффективность олигомеров, действующих за счет D-петель, происходит от высокой аффинности связывания с комплементарной последовательностью и обеспечивает модуляцию нормальной биологической функции, связанной с этой нуклеиновой кислотой. Неисчерпывающий перечень типов

нуклеиновых кислот, которые могут служить мишенями, включает: (i) генные последовательности, в том числе экзоны, интроны, сочленения экзонов с нитронами, промоторные/энхансерные участки и 5'- или 3'- концевые нетранслируемые участки, (ii) участки нуклеиновой кислоты, на которых функционируют вторичные структуры (например, стволочно-петлевой элемент TAR ВИЧ или тРНК), (iii) нуклеиновые кислоты, выполняющие структурные или другие функции, например, теломеры, центромеры или источники репликации (вирусы, бактерии и т.п.) и (iv) любой другой двухнитевой участок. Ясно, что можно синтезировать олигомеры с дискретными функциональными доменами, такие, что один участок олигомера связывается с мишенью путем образования D-петель, а соседний участок связывает молекулу-мишень, скажем, за счет образования тройной спирали или связывается с белком как аптамер. Кроме того, олигомер, образующий D-петли, может связываться с каждой нитью двухнитевой структуры, переключая нить, с которой он связывается (т.е. один участок олигомера связывается с одной нитью, а другой участок - с комплементарной нитью). Управляющие элементы, диктующие характер связывания (тройная спираль или D-петля), - это последовательность олигомера и встроенная в него аффинность. Правила распознавания оснований при связывании в двойную структуру по Уотсону-Крику отличаются от правил управляемого связывания в тройную структуру по Хогстену (Hoogsteen). Поэтому последовательность оснований олигомера может быть использована для определения типа правил связывания, по которым будет действовать олигомер. В природе D-петлевые структуры образуются в ходе процессов, опосредованных ферментами (Harris, L.D. et al., J Biol Chem., 1987, 262, 9285 - 9292), или связаны с участками, где происходит репликация ДНК Jacobs, H.T. et al., Nucl Acids Res., 1989, 17, 8949 - 8966). D-петли, образующиеся при связывании олигомеров, образуются в результате одно- или двухступенчатых процессов. Непосредственное вытеснение нити-мишени приводит к образованию D-петли в один этап. Однако, образование D-петель может происходить и в ходе образования тройной спирали, которое облегчает вытеснение нити, приводящее к образованию D-петли.

Для конструирования форм с измененными характеристиками могут быть сконструированы рибозимы, содержащие заместительные связи, предложенные настоящим изобретением. Описаны рибозимы, расщепляющие одонитевые РНК или ДНК (Robertson, D.L., et al., Nature, 1990, 344, 467 - 468). Имеются предложения применять рибозимы в терапевтических целях (Sarver, N. et al., Science, 1990, 247, 1222 - 1225; Международная публикация № WO 91/04319). Вторичные или третичные структуры, необходимые для функционирования рибозимов, могут быть созданы путем конструирования соответствующих олигомерных последовательностей. Например, рибозимы, содержащие устойчивые к воздействию нуклеаз нацеливаемые домены, в которых присутствуют заместительные связи, предложенные настоящим изобретением, обладают более высокой аффинностью, не теряя специфичности спаривания основаниями с последовательностью-мишенью. Благодаря высокой аффинности и/или устойчивости заместительных связей, предложенных настоящим изобретением, к воздействию нуклеаз домен распознавания в рибозиме может быть короче (удобство приготовления), а это приведет к более благоприятному метаболизму субстрата (достоинство функционирования рибозима).

В качестве лекарственных средств олигомеры, предложенные настоящим изобретением, могут быть применены различными способами, подходящими для лечения различных состояний за счет подавления экспрессии соответствующих генов-мишеней. Для этого олигомеры могут быть приготовлены в виде препаратов, применяемых различными способами, в том числе препаратов для системного, наружного или местного применения. Состав препаратов и технологии приготовления можно найти в последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences. Merck Publishing Co., Easton, PA, latest edition. Активное вещество - олигомер - обычно соединяют с носителем, таким как разбавитель или наполнитель, например, сухой наполнитель, вяжущее средство, увлажнитель, диспергирующее средство, поверхностно-активное вещество или смазывающее вещество, в зависимости от способа введения и лекарственной формы. К типичным лекарственным формам относятся таблетки, порошки, жидкие формы, в том числе суспензии, эмульсии и растворы; гранулы, капсулы и суппозитории, а также жидкие препараты для инъекций, в том числе липосомные препараты.

Предпочтительным способом системного применения являются инъекции, в том числе внутримышечные, внутривенные, внутривагинальные и подкожные. Для инъекций олигомеры, предложенные настоящим изобретением, готовят в виде жидких растворов, предпочтительно, в физиологически приемлемых буферах, таких как раствор Хэнкса (Hanks) или Рингера (Ringer). Кроме того, олигомеры можно приготовить в виде твердого вещества, растворимого или взвешиваемого непосредственно перед применением. Возможны и лиофилизированные формы. Предпочтительными для системного применения являются дозы в пределах от около 0,01 мг/кг до 50мг/кг один или два раза в день. Однако, можно применять различные схемы дозирования в зависимости от (i) степени подавления данным олигомером активности ДНК или РНК-мишени, (ii) тяжести или степени развития патологического состояния, связанного с данным геном, или (iii) фармакокинетических свойств данного олигомера.

При системном применении возможно введение препарата через слизистые оболочки, кожу или внутрь. При введении через кожу и слизистые оболочки в препаратах используются вещества, способствующие проникновению. Их выбор зависит от барьера, сквозь который необходимо проникнуть. Эти вещества известны специалистам. К ним относятся, например, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты - для введения через слизистые оболочки. Кроме того, для увеличения пенетрантности используются детергенты. Введение через слизистые оболочки можно осуществлять при помощи аэрозолей для носа или, например, суппозитория. Для приема внутрь олигомеры готовят в виде традиционных лекарственных форм для приема внутрь, например, капсул, таблеток и микстур.

Для наружного применения олигомеры, предложенные настоящим изобретением, готовят в виде мазей, гелей или кремов известными специалистами способами. Препараты на основе олигомеров, предложенных настоящим изобретением, для введения в глаза, например, при вирусных инфекциях, готовят в соответствии с технологиями, принятыми в отрасли.

Олигомеры, предложенные настоящим изобретением, могут быть использованы не только как лечебные средства, но и как диагностические препараты, при помощи которых определяется присутствие или отсутствие заданных последовательностей нуклеиновых кислот, с которыми олигомеры специфически связываются. Повышенная аффинность связывания, присущая олигомерам, предложенным настоящим изобретением, является их преимуществом при использовании их в качестве затравок и зондов. Диагностические тесты проводят посредством гибридизации с образованием двойной или тройной спирали, которую затем исследуют традиционными способами. Например, олигомеры можно пометить радиоактивными, флуоресцентными или хромогенными метками и определить присутствие меток, связанных с твердой подложкой. Кроме того, присутствие двойной или тройной спирали можно определить при помощи антител, которые специфически распознают эти формы. Средства проведения анализа с использованием таких олигомеров в качестве зондов известны специалистам.

Использование олигомеров с заместительными связями, предложенными настоящим изобретением, в качестве диагностических препаратов, действующих за счет образования тройной спирали, удобно, так как тройные спирали образуются в мягких условиях, и анализ можно проводить, не помещая анализируемые образцы в жесткие условия. Диагностические тесты, основанные на обнаружении РНК для выявления последовательностей, характерных для бактерий, грибов и простейших, часто требуют выделения РНК из образцов или организмов, выращенных в лаборатории, что очень сложно и отнимает много времени, так как РНК крайне чувствительна к вездесущим нуклеазам.

Олигомерные зонды могут содержать дополнительные модификации, такие как модификации Сахаров и/или заместительные связи, которые делают олигомеры особенно устойчивыми по отношению к нуклеазам, и тогда они будут полезными для тестов, проводимых в присутствии клеточных или тканевых экстрактов, где обычно присутствует нуклеазная активность. Олигомеры, содержащие концевые модификации, часто сохраняют способность связываться с комплементарными последовательностями, не теряя специфичности (Uhlir et al., Chemical Reviews, 1990, 90, 543 - 584). Как сказано выше, в зондах, предложенных настоящим изобретением, могут содержаться линкеры, обеспечивающие специфическое связывание с обеими нитями ДНК (Froehler, B.C. et al., Biochemistry, 1992, 31, 1603 - 1609; Home et al., J Am Chem Soc., 1990, 112, 2435 - 2437).

Включение аналогов оснований, предложенных настоящим изобретением, в зонды, содержащие также группы, образующие ковалентные перекрестные связи, может повысить чувствительность и снизить фон в диагностических тестах или тестах на обнаружение. Кроме того, применение перекрестно-связывающих агентов связано с изменением техники анализа: (1) перекрестная связь повышает дискриминацию зонда, (2) для снижения фона проводится денатурирующее промывание, (3) гибридизация и перекрестное связывание проводится при температуре, близкой к температуре плавления гибрида для ослабления вторичной структуры мишени и для повышения специфичности зонда. Изменение условий гибридизации описано у (Gamper et al., Nucleic Acids Res., 1986, 14, 9943).

Олигомеры, предложенные настоящим изобретением, пригодны для использования в диагностических тестах, проводимых в соответствии со способами, согласно которым либо олигомер, либо нуклеиновая кислота, которую следует обнаружить, ковалентно связаны с твердой подложкой (патент США № 4775619). Эти олигомеры также пригодны для применения в диагностических тестах, основанных на технике цепной полимеразной реакции, амплифицирующей последовательности-мишени, как описано в Европейской патентной публикации № 0393744. Олигомеры, предложенные настоящим изобретением, имеющие 3'-конец, который может служить затравкой, совместимы с полимеразными, используемыми в цепных полимеразных реакциях, такими как полимеразы Taq или Vent™ (New England Biolabs). Таким образом, олигомеры, предложенные настоящим изобретением, можно использовать в качестве затравок в протоколах цепных полимеразных реакций. Олигомеры, предложенные настоящим изобретением, могут быть использованы как затравки, представляющие собой дискретную последовательность, или как затравки со случайной последовательностью. Затравки со случайной последовательностью обычно имеют длину 6, 7 или 8 нуклеомонеров. Такие затравки можно использовать в различных схемах амплификации нуклеиновых кислот (полимеразных или лигазных цепных реакциях и т.д.) или в процедурах клонирования. Заместительные связи, предложенные настоящим изобретением, обычно не ослабляют способность олигомера функционировать в качестве затравки.

Олигомеры, предложенные настоящим изобретением, имеющие 2'-модификации на участках, отличных от 3'-конечного остатка, и другие модификации, придающие им некомпетентность по отношению к рибонуклеазе H или другого рода невосприимчивость к действию нуклеаз, удобно использовать в качестве зондов или затравок для последовательностей РНК или ДНК в клеточных экстрактах или других растворах, содержащих нуклеазы. Так, олигомеры можно использовать в процедурах амплификации нуклеиновых кислот в образце путем смешивания олигомера с образцом, содержащим заданную нуклеиновую кислоту, с последующей гибридизацией олигомера с заданной нуклеиновой кислотой и амплификацией заданной нуклеиновой кислоты при помощи полимеразных или лигазных цепных реакций или других подходящих способов.

Производные от олигомеров и хелатирующих агентов, таких как ЭДТА (EDTA), диэтилтриаминпентауксусная кислота (DTPA) или аналоги 1,2-диаминциклогексан уксусной кислоты, могут быть использованы в различных диагностических тестах *In vitro*, как описано в патентах США №№ 4772548, 4707440 и 4707352. Кроме того, от олигомеров, предложенных настоящим изобретением, можно получить

производные при помощи перекрестно-связывающих агентов, таких как 5-(3-йодацетамидопроп-1-ил)2'-дезоксигуанидин или 5-(3-(4-бромбутирамид)проп-1-ил)-2'-дезоксигуанидин, и использовать в различных аналитических наборах и способах, как описано в международной публикации № WO 90/14353.

В дополнение к сказанному выше, способность олигомеров подавлять экспрессию генов может быть проверена в системах *In vitro* путем измерения уровней экспрессии в клетках, а в рекомбинантных системах - любым подходящим способом (Graessmann, M et al, Nucleic Acids Res., 1991, 19, 53 - 59).

Выше приведено описание изобретения, а для того, чтобы лучше разъяснить его, предлагаем нижеследующие примеры. Примеры даны в качестве иллюстрации к настоящему изобретению, и не следует толковать их как ограничение объема изобретения.

Примеры

Коротко о синтезе нуклеомономерных синтонов и олигомеров

Олигомеры, предложенные настоящим изобретением, могут быть синтезированы в ходе реакций, известных специалистам в области синтеза производных олигонуклеотидов. См. напр., Flandor, J and Yam, S.Y., Tetrahedron Letts., 1990, 31, 597 - 600; Mattson, R.J., et al., J Org Chem., 1990, 55, 2552 - 2554; Chung, C.K. et al., J Org Chem., 1989, 54, 2767 - 2769.

Как видно из Таблицы 1, в которой приведены разнообразные заместительные связи, заместительные связи, предложенные настоящим изобретением, могут быть весьма разнообразными и содержать один или несколько атомов азота, серы и/или кислорода. Позиция этих атомов в заместительной связи может быть 5'-концевой, "серединной" или 2'-, 3'-или 4'-концевой. Этот раздел снабжен схемами ряда характерных реакций синтеза, указывающими "путь" к различным расположениям и сочетаниям атомов азота и кислорода в заместительных связях.

Процедуры синтеза, проиллюстрированные фиг. 1 - 25, можно видоизменить, как известно специалистам в области химии олигонуклеотидов. Например, защита оснований не всегда обозначена на схемах синтеза, но она может потребоваться, и тогда ее можно осуществить с использованием реактивов и технологий, известных специалистам. См. напр. Protective Groups In Organic Synthesis (Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, 1981). Подобным образом, в некоторых случаях, использование протекторных групп отражено на схемах, но оно не всегда необходимо при синтезе олигомеров, предложенных настоящим изобретением.

Пример 1

Первые пять этапов, изображенные на фиг. 1, относятся к приготовлению аминоспирта серинола, защищенного изобутирилом. Шестой и последующие этапы направлены на получение строительной единицы - тимин фосфорамидита, замещенного серинолом.

На этапе 1 по фиг. 1 аминогруппу аминокислоты серина защищают посредством реакции соединения 1 с ди-трет-бутилкарбонатом, дающей соединение 2. Можно использовать другие эквивалентные прожекторные группы. На следующем этапе β-гидроксильную группу соединения 2 блокируют дигидропираном и получают полностью защищенную аминокислоту 3. Затем проводят реакцию аминокислоты 3 с комплексом диборан-диметилсульфид и получают спирт 4, который, взаимодействуя с изобутирил хлоридом, дает соединение 5. Эта реакция восстановления может быть проведена с использованием изобутилхлорформата и натрия борогидрида (K. Ramasamy, R.K. Olsen and T. Emery Synthesis, 1982, 42). Реакция соединения 5 с трифторуксусной кислотой, проводимая в течение 30 минут, с последующим промыванием NaHCO₃, дает соединение 6.

Тиминуксусную кислоту 7 готовили, как описано в литературе (L. Kosynkina, W. Wang and T.C. Llang, Tetrahedron Letts., 1994, 35, 5173). Соединение веществ 7 и 6 по принципу смешанного ангидрида дало 8. Диметокситриэтирование соединения 8 при помощи DMTCI дало соединение 9, которое после гидролиза основанием дало 10. Фосфитирование 10 при стандартных условиях дало строительную единицу 11 - тимин, соединенный с серинолом. Этот синтон можно добавить к наращиваемому олигомеру стандартными способами. Для связывания мономеров или димеров способом, аналогичным описанному выше, может быть использована любая химия синтеза ДНК, например, фосфорамидатная или фосфонатная.

Пример 2

Как видно на фиг. 2, тиминачетальдегид 13 получили посредством обработки тимина бромацетальдегид-диметилацеталем с последующим гидролизом 12 при помощи водной трифторуксусной кислоты. Затем соединили альдегид 13 и амин 6 и преобразовали соответствующий промежуточный продукт в фосфорамидитную строительную единицу 17 способом, аналогичным этапам фиг. 1.

Пример 3

Исходным материалом для реакции, изображенной на фиг. 3, является β-замещенная аминокислота 18. Замещенную аминокислоту можно преобразовать в фосфорамидитную строительную единицу 27, в соответствии с процедурой, изображенной на фиг. 1 и 2.

Пример 4

Согласно фиг. 4, исходный аминоспирт 21 окисляют смесью CrO₃/пиридин и получают альдегид 28. Этот альдегид при реакции с алкил галогенидом в присутствии основания дает соединение 29. Аминоспирт 29 можно преобразовать в строительную единицу 35 способом, аналогичным изображенному на фиг. 1 и 2.

Пример 5

Первые четыре этапа, изображенные на фиг. 5, в основном те же, что и изображенные на фиг. 1, но вместо серина используется аспарагиновая кислота. Метиловый эфир аспарагиновой кислоты 36 дал полностью защищенный спирт 40, который после избирательной депротекции при помощи уксусной кислоты дал 41.

Окисление 41 смесью CrO_3 /пиридин дало соответствующий альдегид 42. Восстановительное аминирование альдегида 42 О-бензилгидроксиламином в присутствии натрия триацетоксиборогидрида должно давать 43 (см. T. Kolasa and M. J. Miller, J Org Chela., 1990, 55, 1711). Затем спирт 39 преобразуют в альдегид 46, в основном, в тех же условиях, что и описанные выше, но с аллиловой протекторной группой для гидроксильной функциональной группы 39. Соединение альдегида 46 с гидроксиламином 43 в присутствии натрия триацетоксиборогидрида с последующим удалением аминопротекторных групп должно дать бисамин 48. Бисамин 48 можно преобразовать в димер 53 в соответствии с процедурой, изображенной на фиг. 1.

Пример 6

Согласно фиг. 6, соединение спирта 54 с О-бензилгидроксиламином 55 в условиях реакции Мицунобу (Mitsunobu) (см: O. Mitsunobu, Synthesis, 1981, 1) дает соединение 56. Промежуточное соединение 56 после гидрогенизации и ацетилирования дает 57. Обработка 57 трифторуксусной кислотой снимает протекторную группу "TBDMSI" и дает 58. Соединение 58 и 7 с последующим диметокситритилированием дает 60. Законченную строительную единицу 62 получают из 60 при помощи основного гидролиза с последующим фосфитилированием.

Пример 7

Согласно фиг. 7, сериол 4 преобразуют в галогенид 59 и алкилируют с тимином, получая 63. С соединения 63 удаляют протекторные группы, соединяют его с оксиуксусной кислотой, защищенной DMT, фосфитилируют и получают 66.

Пример 8

Согласно фиг. 8, спирт 64 соединяют с N-гидроксиламинпропановой кислотой 69 и получают 70. Алкилирование тимина с галогенидом 73 дает 74, которое после удаления протекторных групп, соединения с 76 и гидролиза дает 78. Конденсация 78 с 70 с последующим фосфитилированием должна давать гидроксаматный димер 80.

Пример 9

Согласно фиг. 9, N-гидроксиламинпропановый альдегид 81 соединяют со спиртом 64. Димер 88 получают из 83 и 86 в соответствии с процедурой, изображенной на фиг. 8.

Пример 10

Согласно фиг. 10, алкилирование (см. T. Kolasa and M. J. Miller, J Org Chem.f 1990, 55, 4246) метилового эфира α -бром- β -аминопропановой кислоты 89 с тимином дает 90. Промежуточное соединение 90 после гидролиза гидроксидом натрия дает кислоту 91, которую соединяют с 6 и получают 92. Затем соединение 92 преобразуют в фосферамидитную строительную единицу 95 в соответствии с этапами, изображенными на фиг. 1.

Пример 11

Согласно фиг. 11, тимин алкилируют с алкиламином галогенидом 96 (о приготовлении аминоксилгалогенидов см.: R.K.Olsen, K.Ramasamy and T. Emery J. Org. Chem., 1984, 49, 3527 and Islam et al., J. Med. Chem., 1994, 37, 293 - 304) и получают 97. Обработка соединения 97 трифторуксусной кислотой с последующим алкилированием дает 100. Строительную единицу 103 получают из 100 посредством диметокситритилирования, гидролиза и фосфитилирования.

Пример 12

Фиг. 12 иллюстрирует альтернативный способ получения димера 111 с гидроксаматным скелетом из N-гидроксиламина 43 и альдегида 107, который, в свою очередь, получают из аспарагиновой кислоты.

Пример 13

Как видно на фиг. 13, димер 115 получают из промежуточного соединения 108 и 13 в соответствии с процедурой, изображенной на фиг. 2.

Пример 14

Согласно фиг. 14, готовят N-гидроксилтимин (Klirn, C. U., et al., Tetrahedron Letts., 1992, 33, 25 - 28) и, соединяя его с N-гидроксифталимидом, получают 117, которое при обработке гидразином в этаноле дает 118. Обработка соединения 118 глицерин эпоксидом 119, защищенным DMT, дает 120. Затем промежуточное соединение 120 преобразуют в фосферамидит 121 в соответствии со стандартной процедурой. В ходе второго процесса соединения 118 соединяют с аминоксидом 122 в условиях восстановительного аминирования и получают 123. Защита вторичной функциональной аминогруппы при помощи FMOCCI с последующим гидролизом дает 125.

Пример 15

Согласно фиг. 15, 1,2-дигидроксипропановую кислоту 126 соединяют с N-гидроксиламин-тимином 118 и получают 127, которое преобразуют в фосферамидитный синтон 129 в стандартных условиях. Соединение 118 также соединяют с адипиновой кислотой и преобразуют в строительную единицу 133 нуклеиновой кислоты.

Пример 16

Согласно фиг. 16, сначала синтезируют строительную единицу 136 из 118 и 134, подобно тому, как показано на фиг. 1. Соединение 139 и 118 дает 140. Обработка 137 при помощи 118 дает 138, которое после конденсации со 140 дает димер 141.

Пример 17

Согласно фиг. 17, альдегид 142 соединяют с бензиловым эфиром глицина и получают 143. Обработка соединения 143 соединением 7 дает 145, которое, взаимодействуя с уксусной кислотой, дает 148.

Алкилирование 148 в условиях реакции Мицунобу (Mitsunobu) с Вос-NH-O-ацетилгидроксиламином дает 147, из которого посредством гидрогенизации можно получить строительную единицу 150. Аналогичное соединение

143 с 13 и вышеупомянутые реакции дают синтон 149.

Пример 18

Как видно на фиг. 18, восстановительное аминирование альдегида 142 Вос-NH-O-бензилгидроксиламином дало 151. Гидрогенизация 151 с последующим алкилированием 152 гликолевой кислотой 153 (B. C. Borer and D. C. Balogh, Tetrahedron Letts., 1991, 32, 1039) дает 154. За счет обработки 154 трифторуксусной кислотой удаляют протекторную группу Вос, затем проводят соединение и получают 155. Гидроксильную протекторную группу соединения 155 можно удалить при помощи уксусной кислоты и получить 156. Соединение 156 преобразуют в строительную единицу 157 при помощи стандартных реакций. Подобным образом, строительную единицу 158 получают путем соединения 154 и 13 с последующим выполнением процедур, необходимых для получения 157.

Пример 19

Согласно фиг. 19, алкилирование тимин-N-гидроксиламина 160 спиртом 162 дает 163. Соединение 163 может быть преобразовано в фосфорамидитную строительную единицу 166 посредством процедур, представленных на фиг. 1.

Пример 20

Как видно на фиг. 20, сначала в стандартных условиях из глутаминовой кислоты синтезируют промежуточное соединение 169. Алкилирование тимина при помощи 169 дает 170, которое при обработке трифторуксусной кислотой дает 171. Промежуточное соединение 171 можно соединить с Вос-глицином и получить 173, которое при гидролизе дает мономерный синтон 174. Подобным образом можно получить 172: посредством соединения 118 с Вос-аминоуксусным альдегидом с последующим гидролизом бензильного эфира.

Пример 21

Согласно фиг. 21, в стандартных условиях готовят промежуточное соединение 177 из Вос-NH-O-бензилгидроксиламина и 175. Гидрогенизация 177 с последующим соединением с N-гидрокситиминном 116 дает 178. Удаление протекторной группы ТНР с последующим диметокситритилированием и фосфитилированием дает синтон 181. Следуя описанным выше процедурам, но используя ТНР-оксиуксусный альдегид вместо ТНР-оксиуксусной кислоты, можно получить 182.

Пример 22

Как видно на фиг. 22, строительную единицу 191 можно получить из известного исходного материала 183, следуя условиям реакций, приведенным в нижней части фиг. 22.

Пример 23

Как видно на фиг. 23, синтез строительной единицы 199 можно осуществить, используя исходный материал 183 и следуя условиям реакций, приведенным в нижней части фиг. 23.

Пример 24

Согласно фиг. 24, исходный материал 200 преобразуют в строительную единицу 207, следуя условиям реакций, приведенным в нижней части фиг. 24.

Пример 25

Соединения, использованные и полученные в этом примере, показаны на фиг. 1.

Серии (1): тимин (37,8г, 300ммоль) растворили в растворе гидроксида калия (64,5г, 1150ммоль) в 200мл воды. Этот раствор подогревали на водяной бане в 40°C в течение 1 часа и за это время добавили к нему раствор бромуксусной кислоты (62,5г, 450ммоль) в 100мл воды. Реакционную смесь перемешивали при этой температуре еще в течение часа. Затем ее оставили остывать при комнатной температуре и, когда смесь остыла, при помощи концентрированной HCl довели pH до 5,5. Затем смесь охлаждали в холодильнике в течение 2 часов. Образовавшийся осадок (непрореагировавший тимин) удалили посредством фильтрации. Затем pH смеси довели до 2 при помощи концентрированной HCl и поместили смесь в холодильник на 2 часа. Посредством фильтрации собрали белый осадок, который сушили в вакуумном сушильном шкафу при 40°C в течение 6 часов. Выход составил 44г (88%).

Метилловый эфир N-Вос-L-серина (2): метилловый эфир L-серина (15,6г, 100ммоль) взвесили в тетрагидрофуране/N,N-диметилформамиде (THF/DMF) (по 100мл каждого) при комнатной температуре. К этой смеси при перемешивании добавили триэтиламин (11,13г, 110ммоль), затем ди-трет-бутил дикарбонат (24,0г, 110ммоль) и продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение 30 минут. Добавили воду (20мл) и перемешивали смесь в течение 8 часов при комнатной температуре. Смесь выпарили досуха. Остаток взвесили в этилацетате (250мл) и обработали гидросульфатом калия (0,25 N, 100мл). Продукт немедленно экстрагировали раствором этилацетата. Органический экстракт промыли водой (100мл), соляным раствором (100мл) и высушили над безводным сульфатом натрия. Выпаривание органического растворителя дало маслянистый остаток в 26г (90%).

Метилловый эфир N-Вос-L-серина (ОТНР)(3): соединение 2 (15г, 68,49ммоль) растворили в сухом CH₂Cl₂ (100мл) и обработали 3,4-дигидро-2Н-пираном (8,4г, 100ммоль) и р-толуол сульфоновой кислотой в количестве, достаточном для каталитического действия (100мг), при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов, затем выпарили досуха. Остаток растворили в этилацетате (200мл), промыли 5% раствором NaHCO₃ (100мл), водой (50мл) и соляным раствором (50мл). Органический экстракт высушили над безводным Na₂SO₄ и выпарили досуха. Остаток был достаточно чистым и был использован на следующем этапе в таком виде. Выход: 15г(72%).

N-Вос-L-серин (ОТНР) (4): метилловый эфир серина (ОТНР) (10г, 33ммоль) растворили в сухом тетрагидрофуране (100мл) и охладили до 0°C на ледяной бане в аргонной атмосфере. К этому холодному

раствору при перемешивании в течение 1 часа при 0°C добавляли комплекс боран-метилсульфид (2 М раствор в тетрагидрофуране, 100мл, 200ммоль). После добавления борана реакционную смесь нагрели до комнатной температуры и в течение 6 часов держали при температуре 40°C. Реакционную смесь охладил до 0°C, 5 нейтрализовали при помощи воды и уксусной кислоты до pH 6 - 7 и экстрагировали эфиром (3 x 100мл). Эфирный экстракт промыли водой (2 x 100мл) и соляным раствором (100мл), высушили над безводным Na₂SO₄, выпарили досуха и получили сырой продукт в виде масла. Очистка масла на испарительной колонке с силикагелем и гексаном -> ацетоном в качестве элюента дала 8г (88%) чистого продукта.

10 N-Вос-Л-серин (ОТНР) ОIb(5): при перемешивании и при 0°C к раствору соединения 4 (8г, 29,09ммоль) в сухом CH₂Cl₂ (100мл) добавили TEA (3,54г, 35ммоль), затем изобутирил хлорид (3,71г, 35ммоль) за 30 минут. Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, после чего выпарили досуха. Остаток растворили в этилацетате (EtOAc) (200 мл), промыли 5% раствором NaHCO₃ (50мл), водой (50мл) и соляным раствором (50мл). Органический экстракт высушили над безводным Na₂SO₄, высушили досуха и получили сырой продукт в виде масла. Очистка масла на испарительной колонке с силикагелем и 15 гексаном -> ацетоном в качестве элюента дала 7,9г (79%) чистого продукта.

20 L-серинол (Olb) (6): соединение 5 (10г, 28,98ммоль) растворили в CH₂Cl₂ (100мл), в течение 1 часа перемешивали при комнатной температуре с трифторуксусной кислотой (50мл), затем выпарили досуха. Остаток растворили в метаноле (50мл) и снова выпарили. Остаток растворили в CH₂Cl₂ (200мл), промыли насыщенным раствором NaHCO₃ (2 x 100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Органический экстракт высушили над безводным Na₂SO₄, выпарили досуха и получили 4,5г (96%) продукта в виде масла.

25 N-(тиминилацетил)-L-серинол (O1b) (8): тиминуксусную кислоту 7 (7,3г, 40ммоль) и N-метилморфолин (4,4мл, 40ммоль) растворили в 100мл N,N-диметилформамида. Раствор охладил до -20°C в аргонной атмосфере. К этому холодному раствору при перемешивании в один прием добавили изобутил хлорформат (5,2мл, 40ммоль). Через 15 минут добавили раствор соединения 6 (6,44г, 40ммоль) в 30мл N,N-диметилформамида (охлажденный до той же температуры). Реакционную смесь перемешивали при -20°C в течение 30 минут, затем нагрели до комнатной температуры и продолжали перемешивание в течение 1 часа. Реакционную смесь выпарили досуха, а остаток растворили в CH₂Cl₂ (200мл). Органический раствор промыли 5% раствором NaHCO₃ (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Органический экстракт высушили над безводным Na₂SO₄, выпарили досуха и получили сырой продукт в виде пены. Сырой продукт очистили на испарительной колонке с силикагелем и CH₂Cl₂ -> ацетоном в качестве элюента и получили 12г (92%) чистого продукта.

30 4,4'-диметокситритил-N-(тиминилацетил)-L-серинол (Olb)(9): соединение 8 (10г, 30,58ммоль) выпарили вместе с сухим пиридином (3 x 50мл) и растворили в сухом пиридине (100мл). К этому раствору добавили TEA (3,54г, 35ммоль), затем DMTCl (11,83г, 35ммоль) при комнатной температуре в аргонной атмосфере. Реакционную смесь перемешивали в течение 12 часов, погасили метанолом (20мл) и перемешивали в течение 30 минут. Раствор выпарили досуха и растворили в CH₂Cl₂ (200мл). Органический экстракт промыли 5% 35 раствором NaHCO₃ (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Слой CH₂Cl₂ высушили над безводным Na₂SO₄, выпарили досуха и получили сырой продукт в виде пены. Сырой продукт очистили на испарительной колонке с силикагелем и CH₂Cl₂ -> ацетоном в качестве элюента и получили 17г (88%) чистого продукта.

40 1-О-(4,4' -диметокситришил)-2-[амин (тиминилацетил)] -L-пропан-1,3-диол (10): соединение 9 (10г, 15,89ммоль) растворили в метаноле (20мл). К этому раствору при 0°C добавили 1N раствор NaOH (20мл, 20ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа, затем погасили уксусной кислотой, доведя pH до 7. Раствор экстрагировали EtOAc (2 x 100мл). Органический экстракт промыли 5% раствором NaHCO₃ (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Слой EtOAc высушили над безводным Na₂SO₄, выпарили досуха и получили сырой продукт в виде пены. Сырой продукт очистили на испарительной колонке с силикагелем и CH₂Cl₂ -> ацетоном в качестве элюента и получили 8,2г (92%) чистого продукта.

45 1'-О-(4,4'-диметокситритил)-2-[амин (тиминилацетил)]-L-пропан-3'-О-(N,N-диизопропил)-β-цианэтилфосфорамидит (11): соединение 10 (8,00г, 14,31ммоль) выпарили вместе с сухим пиридином (3 x 50мл) и сушили над твердым NaOH в вакууме в течение ночи. Сухой материал растворили в сухом CH₂Cl₂ (100мл) и охладил до 0°C в аргонной атмосфере. К этому 50 холодному раствору в аргонной атмосфере добавили N,N-диизопропилэтиламин (5,23г, 25ммоль), затем 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (4,72г, 20,00ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при 0°C и в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавили CH₂Cl₂ (100мл). Раствор в CH₂Cl₂ промыли 5% раствором NaHCO₃ (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Слой CH₂Cl₂ высушили над безводным Na₂SO₄, выпарили досуха и получили сырой продукт в виде пены. 55 Сырой продукт очистили на испарительной колонке с силикагелем, с CH₂Cl₂ -> ацетоном, содержащим 1% TEA, в качестве элюента и получили 10г (x%) чистого продукта. Массу высушивали над твердым NaOH в вакууме в течение ночи. Массу растворили в CH₂Cl₂ (15мл) и в течение часа в аргонной атмосфере каплями добавляли в перемешиваемый раствор сухих гексанов (2000мл). После добавления растворенной в CH₂Cl₂ массы образовался осадок, который перемешивали еще в течение часа, затем отфильтровали, промыли сухими 60 гексанами (200мл) и в течение ночи сушили над твердым NaOH. Выход: 9,5г (87%).

Пример 26 (смотри фиг. 26)

65 N-(трет-бутилоксикарбонил)-О-бензил-L-серин (2.): О-бензил-L-серин 1 (10г, 51,28ммоль) взвесили в тетрагидрофуране/H₂O (8 : 2, 100мл) при комнатной температуре. К этой смеси при перемешивании добавили триэтиламин (6,06г, 60ммоль), затем ди-трет-бутил дикарбонат (13,08г, 60ммоль) и продолжали перемешивание в течение ночи при комнатной температуре. Гомогенный раствор выпарили досуха и растворили остаток в этилацетате (300мл). Органический экстракт промыли 0,5N раствором гидросульфата калия (100мл), водой

(100мл) и соляным раствором (50мл). Экстракт в этилацетате высушили над безводным сульфатом натрия, выпарили досуха и получили 14г (93%) маслянистого остатка.

N-(трет-бутилоксикарбонил)-О-бензил-L-серинол (3'): N-(трет-бутилоксикарбонил)-О-бензил-L-серин (2) (6,0г, 20,34ммоль) растворили в сухом тетрагидрофуране и охладили до -20°C в аргонной атмосфере. К этому холодному раствору при перемешивании добавили TEA (2,32г, 23ммоль) и изобутил хлорформат (3,13г, 23ммоль). Перемешивание продолжали в течение 30 минут при -20°C в аргонной атмосфере. Реакционную смесь немедленно профильтровали под покровом аргона, а осадок промыли сухим тетрагидрофураном (50мл). Соединенный фильтрат медленно добавили в холодный (0°C) раствор NaBH_4 (7,4г, 200ммоль) в тетрагидрофуране/воде (80 : 20, 200мл) в течение 10 минут. После этого реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов при 0°C, затем при помощи уксусной кислоты pH довели до 7. Раствор выпарили досуха, разделили между этилацетатом/водой (300:150 мл) и экстрагировали этилацетатом. Органический экстракт промыли соляным раствором (100мл), высушили над безводным сульфатом натрия и выпарили досуха. Сырой продукт очистили на испарительной хроматографической колонке с силикагелем, с CH_2Cl_2 - > EtOAc в качестве элюента. Чистый продукт объединили, выпарили досуха и получили 4,7г (82%) чистого продукта в виде масла. ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1,41 (s, 9H, Boc), 3,60 - 3,70 (m, 4H), 3,82 (d, 2H), 4,53 (s, 2H, OCH_2Ph), 5,20 (bs, 1H, NH) и 7,30 - 7,40 (m, 5H, Ph).

N-(трет-бутилоксикарбонил)-О-бензил-L-серинол-О-Ib (4): к высушенному раствору N-(трет-бутилоксикарбонил)-О-бензил-L-серинола 3 (4,3г, 14,3ммоль) в сухом пиридине (50мл) добавили TEA (2,02г, 20ммоль) при комнатной температуре. К этому раствору при перемешивании добавили изомасляный ангидрид (3,16г, 20ммоль) и продолжали перемешивание в течение ночи в аргонной атмосфере. Реакционную смесь выпарили досуха, разделили между EtOAc (100мл) и NaHCO_3 (5% раствор, 100мл) и экстрагировали EtOAc. Органический экстракт промыли водой (100мл), соляным раствором (50мл) и высушили над безводным Na_2SO_4 . Высушенный раствор выпарили досуха и получили сырой остаток. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с гексаном - > EtOAc в качестве элюента. Очищенные фракции соединили, выпарили и получили маслянистый продукт в количестве 4,5г (84%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_3), 1,39 (s, 9H, Boc), 2,46 (m, 1H, IbCH), 3,40 (m, 2H), 3,92 (m, 2H), 4,12 (m, 1H), 4,46 (s, 2H, OCH_2Ph), 6,84 (d, 1H, NH) и 7,24 - 7,40 (m, 5H, Ph).

N-(тиминилацетил)-О-бензил-L-серинол-О-Ib (6): N-(трет-бутилоксикарбонил)-О-бензил-L-серинол-О-Ib 4 (4,3г, 12,25ммоль) перемешивали при комнатной температуре в трифторуксусной кислоте (20мл) и CH_2Cl_2 (20мл) в течение 30 минут. Реакционную смесь выпарили досуха, растворили в сухом CH_3OH (10мл) и снова выпарили досуха. Остаток сушили над твердым KOH в вакууме в течение 12 часов. Высушенный остаток использовали в этом виде, без исследования, в последующих реакциях.

Тиминуксусную кислоту 5 (2,76г, 15ммоль) растворили в сухом N,N-диметилформамиде (75мл) и охладили до -20°C в аргоне. К этому холодному раствору при перемешивании добавили N-метилморфолин (1,72г, 17ммоль), затем изобутил хлорформат (2,31г, 17ммоль). После 15-минутного перемешивания раствор вышеупомянутой соли трифторуксусной кислоты в сухом N,N-диметилформамиде (50мл) нейтрализовали N-метилморфолином (1,72г, 17ммоль) и сразу же добавили в холодный перемешиваемый раствор тиминуксусной кислоты. Реакционную смесь перемешивали при -20°C в течение 1 часа, нагрели до комнатной температуры и продолжали перемешивание в течение ночи. Раствор выпарили досуха, а остаток растворили в CH_2Cl_2 (250мл) и воде (100мл) и экстрагировали CH_2Cl_2 - Органический экстракт промыли 5% раствором NaHCO_3 (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Экстракт в CH_2Cl_2 высушили, выпарили досуха и получили сырой продукт. Сырой продукт очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с CH_2Cl_2 - > ацетоном в качестве элюента. Необходимые фракции собрали, выпарили и получили 4,8г (94%) чистого продукта.

Чистый продукт кристаллизовали из CH_2Cl_2 /гексана, точка плавления 122 - 124°C. ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_3), 1,72 (s, 3H, CH_3), 2,44 (t, 1H, IbCH), 3,42 (t, 2H), 4,06 (t, 2H), 4,18 (t, 1H), 4,30 (s, 2H), 4,46 (s, 2H, OCH_2Ph), 7,24 - 7,40 (t, 6H, C_6H и Ph), 8,22 (d, 1H, NH) и 11,22 (s, 1H, NH).

N-(тиминилацетил)-L-серинол-О-Ib (7): N-(тиминилацетил)-О-бензил-L-серинол-О-Ib 6 (2,08г, 5ммоль) растворили в этаноле (50мл). К этому раствору при комнатной температуре добавили $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (0,6г) и циклогексен (5мл). Реакционную смесь в течение 12 часов подогревали до 70°C. Катализатор отфильтровали, промыли метанолом (20мл). Фильтрат выпарили досуха и получили белое твердое вещество. Белое твердое вещество растворили в минимальном количестве MeOH и охладили до комнатной температуры. Продукт выкристаллизовался в виде мелкого порошка, точка плавления 196 - 198°C. Выход: 1,48г (91%). ^1H ЯМР ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_3), 1,72 (s, 3H, CH_3), 2,42 (m, 1H, IbCH), 3,40 (m, 2H), 3,94 (m, 2H), 4,06 (m, 1H), 4,28 (s, 2H), 4,90 (t, 1H, OH), 7,20 (s, 1H, C_6H), 8,12 (d, 1H, NH) и 11,22 (s, 1H, NH).

4,4'-диметокситритил-N-(тиминилацетил)-L-серинол-О-Ib (8): N-(тиминилацетил)-L-серинол-О-Ib 7 (1,48г, 4,5ммоль) растворили в сухом пиридине (50мл) в аргонной атмосфере. К этому раствору при перемешивании добавили TEA (0,51г, 5ммоль) и N,N-диметиламин-пиридин (0,10г). Через 10 минут добавили 4,4'-диметокситритилхлорид (1,69г, 5ммоль) и продолжали перемешивание при комнатной температуре в аргонной атмосфере в течение ночи. Реакционную смесь погасили MeOH (10мл), перемешивали 10 минут и выпарили досуха. Остаток растворили в EtOAc (200мл), промыли 5% раствором NaHCO_3 (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Органический экстракт высушили над безводным Na_2SO_4 и выпарили досуха. Сырой продукт очистили посредством испарительной хроматографии на колонке с силикагелем, с CH_2Cl_2 - > EtOAc в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили 2,5г (88%) пены. ^1H

ЯМР (CDCl_3): 5,104 (d, 6H, IbCH_3), 1,72 (s, 3H, CH_3), 2,40 (m, 1H, IbCH), 3,38 (m, 2H), 3,72 (s, 6H, $2,0\text{CH}_3$), 4,12 (m, 2H), 4,20 (m, 1H), 4,32 (d, 2H), 6,84 (m, 4H, Ph), 7,20 - 7,40 (m, 12H, C_6H и Ph), 8,30 (d, 1H, NH) и 11,28 (s, 1H, NH).

1-О-(4,4'-димеооксишритил)-2-[амин (тиминилацешил)]-L-пропан-1,3-диол (9): 4,4'-диметокситритил-N-(тиминилацетил)-L-серинол-О-Ib 8 (3,4г, 5,41ммоль) растворили в MeOH (30мл) и охладили до 0°C на ледяной бане. К этому холодному раствору при перемешивании добавили 2N NaOH (10мл, 20ммоль) и продолжали перемешивание в течение 30 минут при 0°C. При помощи уксусной кислоты pH смеси довели до 7 и выпарили смесь досуха. Остаток разделили между водой (50мл) и CH_2Cl_2 (150мл) и экстрагировали CH_2Cl_2 . Водный слой также экстрагировали CH_2Cl_2 (50мл). Соединенный органический экстракт промыли соляным раствором (50мл), высушили и выпарили досуха. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на колонке с силикагелем, с CH_2Cl_2 - > ацетоном в качестве элюента. Выход: 3,0г (99%). ^1H ЯМР (CDCl_3): 1,72 (s, 3H, CH_3), 3,0 (т, 2H), 3,42 (т, 2H), 3,72 (s, 6H, $2,0\text{CH}_3$), 3,94 (т, 1H), 4,32 (d, 2H), 4,68 (т, 1H, OH), 6,84 (т, 4H, Ph), 7,20 - 7,40 (т, 12H, C_6H и Ph), 8,06 (d, 1H, NH) и 11,28 (bs, 1H, NH).

1-О-(4,4'-димеоокситритил)-2-[амин (огиминилацешил)]-L-пропан-3-О-(N,N-диизопропил)-β-цианэтилфосфорамидит (10): 1-О-(4,4'-диметокситритил)-2-[амин(тиминилацетил)]-L-пропан-1,3-диол 9 (3,1г, 5,55ммоль) сушили над твердым NaOH в вакууме в течение ночи, затем растворили в сухом CH_2Cl_2 (100мл). Раствор охладили до 0°C в аргонной атмосфере. К этому холодному раствору при перемешивании добавили N,N-диизопропилэтиламин (1,29г, 10ммоль), затем 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (1,96г, 8,3ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при 0°C и в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавили CH_2Cl_2 (100мл) и промыли органический слой 5% раствором NaHCO_3 (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Экстракт в CH_2Cl_2 высушили, выпарили досуха и получили маслянистый остаток. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с CH_2Cl_2 - > EtOAc, содержащим 0,1% TEA, в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили пену. Пену сушили в течение ночи над твердым NaOH в вакууме. Высушенную пену растворили в сухом CH_2Cl_2 (20мл) и каплями добавляли в перемешиваемый сухой гексан (2000мл) в течение часа в аргонной атмосфере. После этого образовавшийся осадок перемешивали еще в течение часа, затем отфильтровали, промыли сухим гексаном (100мл) и сушили твердое вещество над твердым NaOH в вакууме в течение 4 часов. Выход: 3,5г (83%).

Пример 27 (смотри фиг. 27) N-(трет-бутилоксикарбонил)-О-бензил-D-серии (12): О-бензил-D-серин 11 (5г, 25,64ммоль) взвесили в тетрагидрофуране/воде (8 : 2, 70 мл) при комнатной температуре. К этой смеси при перемешивании добавили триэтиламин (4,04г, 40ммоль), затем ди-трет-бутил дикарбонат (6,54г, 30ммоль) и продолжали перемешивание в течение ночи при комнатной температуре. Гомогенный раствор выпарили досуха и растворили остаток в этилацетате (150мл). Органический экстракт промыли 0,5N раствором гидросульфата калия (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Экстракт в этилацетате высушили над безводным сульфатом натрия, выпарили досуха и получили 7,56г (100%) маслянистого остатка.

N-(трет-бутилоксикарбонил)-О-бензил-D-серинол (13): N-(трет-бутилоксикарбонил)-О-бензил-D-серин (10) (7,56г, 25,63ммоль) растворили в сухом тетрагидрофуране и охладили до -20°C в аргонной атмосфере. К этому холодному раствору при перемешивании добавили TEA (3,03г, 30ммоль) и изобутил хлорформат (4,08г, 30ммоль). Перемешивание продолжали в течение 30 минут при -20°C в аргонной атмосфере. Затем реакционную смесь профильтровали под покровом аргона, а осадок промыли сухим тетрагидрофураном (50мл). Соединенный фильтрат медленно добавили в холодный (0°C) раствор NaBH_4 (7,4г, 200ммоль) в тетрагидрофуране/воде (80 : 20, 200мл) в течение 10 минут. После этого реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов при 0°C, затем при помощи уксусной кислоты довели pH до 7. Смесь выпарили досуха, разделили между этилацетатом/водой (300 : 150мл) и экстрагировали этилацетатом. Органический экстракт промыли соляным раствором (100мл), высушили над безводным сульфатом натрия и выпарили досуха. Сырой продукт очистили посредством испарительной хроматографии на колонке с силикагелем, с CH_2Cl_2 - > EtOAc в качестве элюента. Чистый продукт соединили, выпарили досуха и получили 6,68г (92%) чистого продукта в виде масла. ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1,41 (s, 9H, Boc), 3,60 - 3,70 (m, 4H), 3,82 (d, 2H), 4,53 (s, 2H, OCH_2Ph), 5,20 (bs, 1H, NH) и 7,30 - 7,40 (m, 5H, Ph).

N-(трет-бутилоксикарбонил)-О-бензил-D-серинол-О-Ib (14): к высушенному раствору N-(трет-бутилоксикарбонил)-О-бензил-D-серинола 13 (6,6г, 23,5ммоль) в сухом пиридине (50мл) добавили TEA (3,03г, 30ммоль) при комнатной температуре. К этому раствору при перемешивании добавили изомасляный ангидрид (4,74г, 30ммоль) и продолжали перемешивание в течение ночи в аргонной атмосфере. Реакционную смесь выпарили досуха, разделили между EtOAc (200мл) и NaHCO_3 (5% раствор, 100мл) и экстрагировали EtOAc. Органический экстракт промыли водой (100мл), соляным раствором (50мл) и высушили над безводным Na_2SO_4 . Высушенный раствор выпарили досуха и получили сырой остаток. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с гексаном - > EtOAc в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили маслянистый продукт в количестве 8,0г (97%). ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_3), 1,39 (s, 9H, Boc), 2,46 (m, 1H, IbCH), 3,40 (m, 2H), 3,92 (m, 2H), 4,12 (m, 1H), 4,46 (s, 2H, OCH_2Ph), 6,84 (d, 1H, NH) и 7,24 - 7,40 (m, 5H, Ph).

N-(тиминилацетил)-О-бензил-D-серинол-О-Ib (15): N-(трет-бутилоксикарбонил)-О-бензил-D-серинол-О-Ib 14 (5,0г, 14,25ммоль) перемешивали при комнатной температуре в трифторуксусной кислоте (20мл) и CH_2Cl_2 (20мл) в течение 30 минут. Реакционную смесь выпарили досуха, растворили в сухом CH_3OH (10мл) и снова

выпарили досуха. Остаток растворили в CH_2Cl_2 (150мл), при помощи 5% раствора NaHCO_3 pH довели до 7 и экстрагировали раствор CH_2Cl_2 . Органический слой промыли водой (50мл) и соляным раствором (50мл). Экстракт в CH_2Cl_2 высушили и выпарили досуха. Полученный остаток сушили в вакууме над твердым КОН в течение 12 часов. Высушенный остаток в этом виде, без исследования, был использован в последующих реакциях.

Тиминуксусную кислоту 5 (2,57г, 14ммоль) растворили в сухом N,N-диметилформамиде (50мл) и охладили до -20°C в аргоновой атмосфере. К этому холодному раствору при перемешивании добавили N-метилморфолин (1,52г, 15ммоль), затем изобутил хлорформат (2,04г, 15ммоль). После 15-минутного перемешивания в холодный перемешиваемый раствор тиминуксусной кислоты сразу же добавили раствор вышеупомянутого амина в сухом N,N-диметилформамиде (50мл). Реакционную смесь перемешивали при -20°C в течение 1 часа, нагрели до комнатной температуры и продолжали перемешивание в течение ночи. Раствор выпарили досуха, а остаток растворили в CH_2Cl_2 (250мл) и воде (100мл) и экстрагировали CH_2Cl_2 . Органический экстракт промыли 5% раствором NaHCO_3 (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Экстракт в CH_2Cl_2 высушили, выпарили досуха и получили сырой продукт. Сырой продукт очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с CH_2Cl_2 - > ацетоном в качестве элюента. Необходимые фракции собрали, выпарили и получили 2,8г (54%) чистого продукта ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_3), 1,72 (s, 3H, CH_3), 2,44 (m, 1H, IbCH), 3,42 (m, 2H), 4,06 (m, 2H), 4,18 (m, 1H), 4,30 (s, 2H), 4,46 (s, 2H, OCH_2Ph), 7,24 - 7,40 (m, 6H, C_6H и Ph), 8,22 (d, 1H, NH) и 11,22 (s, 1H, NH).

Вещество, указанное в заголовке, приготовили также в соответствии со способом, описанным в связи с приготвлением L-изомера. Использовали следующие реактивы: тиминуксусную кислоту (2,2г, 12ммоль), изобутил хлорформат (1,77г, 13ммоль), N-метилморфолин (1,52г, 15ммоль), соль трифторуксусной кислоты (3,65г, 10ммоль); N-метилморфолин (1,5г, 15ммоль) и сухой N,N-диметилформамид (100мл). Выход: 3,5г (84%).

N-(тиминилацетил)-D-серинол-O-Ib (16): N-(тиминилацетил)-O-бензил-D-серинол-O-Ib 15 (3,5г, 8,39ммоль) растворили в этаноле (50мл). К этому раствору при комнатной температуре добавили $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (1,00г) и циклогексен (10мл). Реакционную смесь в течение 12 часов подогревали до 70°C . Катализатор отфильтровали и промыли метанолом (20мл). Фильтрат выпарили досуха и получили белое твердое вещество. Выход: 2,7г (98%).

^1H ЯМР ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_3), 1,72 (s, 3H, CH_3), 2,42 (m, 1H, IbCH), 3,40 (m, 2H), 3,94 (m, 2H), 4,06 (m, 1H), 4,28 (s, 2H), 4,90 (t, 1H, OH), 7,20 (s, 1H, C_6H), 8,12 (d, 1H, NH) и 11,22 (s, 1H, NH).

4,4'-диметокситритил-N-(тиминилацетил)-D-серинол-O-Ib (17): N-(тиминилацетил)-D-серинол-O-Ib 16 (2,7г, 8,26ммоль) растворили в сухом пиридине (50мл) в аргоновой атмосфере. К этому раствору при перемешивании добавили TEA (1,01г, 10ммоль), затем 4,4'-диметокситритилхлорид (3,38г, 10ммоль) и продолжали перемешивание в течение ночи при комнатной температуре в аргоновой атмосфере. Реакционную смесь погасили MeOH (10мл), затем перемешивали в течение 10 минут и выпарили досуха. Остаток растворили в EtOAc (250мл), промыли 5% раствором NaHCO_3 (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Органический экстракт высушили над безводным Na_2SO_4 и выпарили досуха. Сырой продукт очистили посредством испарительной хроматографии на колонке с силикагелем, с CH_2Cl_2 - > EtOAc в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили 5,0г (96%) пены. ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_3), 1,72 (s, 3H, CH_3), 2,40 (m, 1H, IbCH), 3,38 (m, 2H), 3,72 (s, 6H, 2.0CH_3), 4,12 (m, 2H), 4,20 (m, 1H), 4,32 (d, 2H), 6,84 (m, 4H, Ph), 7,20 - 7,40 (m, 12H, C_6H и Ph), 8,30 (d, 1H, NH) и 11,28 (s, 1H, NH).

1-O-(4,4'-диметокситритил)-2-[амин (тиминилацетил)]-D-пропан-1,3-диол (18): 4,4'-диметокситритил-N-(тиминилацетил)-D-серинол-O-Ib 17 (5,0г, 7,95ммоль) растворили в MeOH (30мл) и охладили до 0°C на ледяной бане. К этому холодному раствору при перемешивании добавили 2N NaOH (10мл, 20ммоль) и продолжали перемешивание в течение 30 минут при 0°C . При помощи уксусной кислоты pH смеси довели до 7 и выпарили смесь досуха. Остаток разделили между водой (50мл) и CH_2Cl_2 (250мл) и экстрагировали CH_2Cl_2 . Водный слой также экстрагировали CH_2Cl_2 (50мл). Соединенный органический экстракт промыли соляным раствором (50мл), высушили и выпарили досуха. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на колонке с силикагелем, с CH_2Cl_2 - > ацетоном в качестве элюента. Выход: 4,0г (90%). ^1H ЯМР (CDCl_3): 1,72 (s, 3H, CH_3), 3,0 (t, 2H), 3,42 (t, 2H), 3,72 (s, 6H, 2.0CH_3), 3,94 (t, 1H), 4,32 (d, 2H), 4,68 (t, 1H, OH), 6,84 (t, 4H, Ph), 7,20 - 7,40 (t, 12H, C_6H и Ph), 8,06 (d, 1H, NH) и 11,28 (bs, 1H, NH).

1-O-(4,4'-диметокситритил)-2-[амин (тиминилацетил)]-D-пропан-3-O-(N,N-диизопропил)- β -цианэтилфосфорамидит (19):

1-O-(4,4'-диметокситритил)-2-[амин (тиминилацетил)]-D-пропан-1,3-диол 18 (2,79г, 5,0ммоль) сушили над твердым NaOH в вакууме в течение ночи, затем растворили в сухом CH_2Cl_2 (100мл). Раствор охладили до 0°C в аргоновой атмосфере. К этому холодному раствору при перемешивании добавили N,N-диизопропилэтиламин (1,29г, 10ммоль), затем 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (1,96г, 8,3ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при 0°C и в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавили CH_2Cl_2 (100мл) и промыли органический слой 5% раствором NaHCO_2 (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Экстракт в CH_2Cl_2 высушили, выпарили досуха и получили маслянистый остаток. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с CH_2Cl_2 - > EtOAc, содержащим 0,1% TEA, в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили пену. Пену сушили в течение ночи над твердым NaOH в вакууме. Высушенную пену растворили в сухом CH_2Cl_2 (20мл) и каплями добавляли в перемешиваемый сухой гексан (2000мл) в течение часа в аргоновой атмосфере. После этого образовавшийся осадок перемешивали еще в течение часа, затем отфильтровали, промыли сухим гексаном (100мл) и сушили твердое вещество над твердым NaOH в вакууме в течение 4 часов. Выход: 3,3г (87%).

Пример 2 8 (смотри фиг. 28)

1-О-бензил-2-[(трет-бутилоксикарбонил) амин]-3-[N₃-бензоил (тиминил)-L-пропанол (21): к перемешиваемому раствору N₃-бензоилтимина 20 (5,75г, 25ммоль) в сухом тетрагидрофуране (200мл) в аргонной атмосфере при комнатной температуре добавили трифенилфосфин (10,48г, 40ммоль) и N₂-α-трет-бутилоксикарбонил-β-бензилокси-L-серинол 3 (5,3г, 18,86ммоль). Через 15 минут медленно (в течение 30 минут) добавили диэтилазодикарбоксилат (6,96г, 40ммоль). Реакционную смесь накрыли алюминиевой фольгой и перемешивали при комнатной температуре в аргонной атмосфере в течение 24 часов. Растворитель выпарили досуха, а остаток растворили в EtOAc (300мл). Органический экстракт промыли 5% раствором NaHCO₃ (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (100мл), затем высушили над безводным Na₂SO₄. Высушенный экстракт в EtOAc выпарили досуха и получили оранжевое масло. Сырой продукт очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с гексаном - > EtOAc в качестве элюента. Фракцию, содержащую требуемый продукт, соединили и выпарили. Получили бледно-розовое масло. Выход: 8,0г (86%). ¹H ЯМР (CDCl₃): 1,41 (s, 9H, Boc), 1,72 (s, 3H, CH₃), 3,56 (m, 2H), 4,20 (m, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,52 (d, 2H, OCH₂Ph), 5,20 (d, 1H, NH), 7,06 (s, 1H, C₆H) и 7,20 - 7,60 (m, 10H, Ph).

2-[(трет-бутилоксикарбонил) амин]-3-[N₃-бензоил (тиминил)-L-пропан-1-ол (22): 1-О-бензил-2-[(трет-бутилоксикарбонил) амин]-3-[N₃-бензоил (тиминил)]-L-пропанол 21 (4,93 г, 10ммоль) растворили в MeOH (100мл) и обработали Pd/C (10%, 1г). Реакционную смесь гидрогенизировали при 344,7кПа (давление водорода) в течение 12 часов. Катализатор отфильтровали, промыли MeOH (50мл), а фильтрат выпарили досуха. Остаток кристаллизовали из ацетона/гексана и получили 3,70г (92%) чистого продукта, точка плавления 156 - 159°C. ¹H ЯМР (CDCl₃): 1,42 (s, 9H, Boc), 1,94 (s, 3H, CH₃), 3,64 (m, 4H), 3,84 (m, 1H), 4,14 (m, 1H), 5,22 (d, 1H, NH), 7,18 (s, 1H, C₆H), 7,48 (t, 2H, Ph), 7,62 (t, 1H, Ph) и 7,98 (d, 2H, Ph).

1-О-изобутирил-2-[(трет-бутилоксикарбонил) амин]-3-[N₃-бензоил (тиминил)-L-пропанол (23): 2-[(трет-бутилоксикарбонил)амин]-3-[N₃-бензоил(тиминил)-L-пропан-1-ол 22 (1,60г, 3,97ммоль) растворили в сухом пиридине (30мл) и перемешивали при комнатной температуре в аргонной атмосфере. К этому раствору при перемешивании добавили TEA (0,51г, 5ммоль) и изомасляный ангидрид (0,79г, 5ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов, затем выпарили досуха. Остаток растворили в EtOAc (150мл) и промыли 5% раствором NaHCO₃ (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Органический экстракт высушили и выпарили досуха. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на колонке с силикагелем, с CH₂Cl₂ - > EtOAc в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили 1,6г (85%) пены. Чистый продукт кристаллизовали из ацетона/гексана, точка плавления 165 - 167°C. ¹H ЯМР (CDCl₃): 1,16 (d, 6H, IbCH₃), 1,42 (s, 9H, Boc), 1,94 (s, 3H, CH₃), 2,52 (m, 1H), 3,64 (m, 4H), 3,84 (m, 1H), 4,14 (m, 1H), 5,22 (d, 1H, NH), 7,18 (s, 1H, C₆H), 7,48 (t, 2H, Ph), 7,62 (t, 1H, Ph) и 7,98 (d, 2H, Ph).

1-О-изобутирил-2-[(β-гидроксиацетил) амин]-3-[N₃-бензоил (таиминил)-L-пропанол (24): 1-О-изобутирил-2-[(трет-бутилоксикарбонил)амин]-3-[N₃-бензоил (тиминил)-L-пропанол 23 (1,6г, 3,38ммоль) перемешивали в смеси трифторуксусной кислоты (5мл) и CH₂Cl₂ (10мл) при комнатной температуре в течение 30 минут, затем выпарили досуха. Остаток растворили в сухом MeOH (10мл) и снова выпарили. Полученный остаток сушили в течение ночи над твердым NaOH в вакууме. Высушенный материал использовали в этом виде для последующих реакций.

К перемешиваемому раствору гликолевой кислоты (0,53г, 7ммоль) в сухом и N,N-диметилформамиде (50мл) добавили 1-гидроксibenзотриазол (0,67г, 5ммоль) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид гидрохлорид (EDC) (1,91г, 10ммоль). После 15-минутного перемешивания при комнатной температуре добавили TEA (1,01г, 10ммоль) и вышеупомянутую соль трифторуксусной кислоты в N,N-диметилформамиде (20мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 12 часов, затем выпарили досуха. Остаток разделили между CH₂Cl₂ (150мл) и водой (100мл) и экстрагировали CH₂Cl₂. Органический экстракт промыли соляным раствором (50мл), высушили и выпарили досуха. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с CH₂Cl₂ - > ацетоном в качестве элюента. Фракции, содержащие требуемый продукт, собрали, выпарили и получили 1,35г (92%) пены. ¹H ЯМР (CDCl₃): 1,16 (d, 6H, IbCH₃), 1,94 (s, 3H, CH₃), 2,52 (m, 1H), 3,20 (bs, 1H), 3,80 - 4,30 (m, 6H), 4,56 (m, 1H), 7,14 (d, 2H, C₆H и NH), 7,50 (t, 2H, Ph), 7,64 (t, 1H, Ph) и 7,94 (d, 2H, Ph).

1-О-изобутирил-2-[(β-(4,4'-диметокситритил)-О-ацетил) амин] -3-[N₃-бензоил (тиминил)-L-пропанол (25): 1-О-изобутирил-2-[(β-гидроксиацетил) амин]-3-[N₃-бензоил (тиминил)-L-пропанол 24 (1,2г, 2,78ммоль) растворили в сухом пиридине (50мл) и перемешивали при комнатной температуре в аргонной атмосфере. К этому раствору при перемешивании добавили TEA (0,35г, 3,5ммоль) и 4,4'-диметокситритил хлорид (1,18г, 3,5ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов, погасили при помощи MeOH (10мл) и выпарили досуха. Остаток растворили в EtOAc (150мл) и промыли 5% раствором NaHCO₃ (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Органический экстракт высушили над Na₂SO₄ и выпарили досуха. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с CH₂Cl₂ - > EtOAc в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили 1,7г (83%) чистого продукта. ¹H ЯМР (CDCl₃): 1,16 (d, 6H, IbCH₃), 1,94 (s, 3H, CH₃), 2,52 (m, 1H), 3,74 (s, 6H, 2,0CH₃), 3,80 - 4,30 (m, 6H), 4,56 (m, 1H), 6,82 (d, 4H, Ph), 7,14 (d, 2H, C₆H и NH) и 7,26 - 8,00 (m, 14H, Ph).

2-[(β-(4,4'-диметокситритил)-О-ацетил)амин]-3-тиминил-L-пропанол (26): 1-О-изобутирил-2-[(β-(4,4'-диметокситритил)-О-ацетил)амин]-3-[N₃-бензоил(тиминил)-L-пропанол 25 (1,55г, 2,05ммоль) растворили в MeOH (20мл) и охладили до 0°C на ледяной бане. К этому холодному раствору при перемешивании добавили 2N NaOH (5мл, 10ммоль) и продолжали перемешивание при 0°C в течение 30 минут.

При помощи уксусной кислоты pH смеси довели до 7 и выпарили смесь досуха. Остаток разделили между водой (50мл) и CH_2Cl_2 (150мл) и экстрагировали CH_2Cl_2 . Водный слой также экстрагировали CH_2Cl_2 (50мл). Соединенный органический экстракт промыли соляным раствором (50мл), высушили и выпарили досуха. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на колонке с силикагелем, с CH_2Cl_2 - > ацетоном в качестве элюента. Выход: 1,0г (99%). ^1H ЯМР (CDCl_3): 1,94 (s, 3H, CH_3), 3,74 (s, 6H, 2,0 CH_3), 3,80 - 4,30 (т, 6H), 4,56 (т, 1H), 6,82 (d, 4H, Ph), 7,14 (d, 2H, C_6H и NH) и 7,26 - 8,00 (т, 14H, Ph).

2-[(β -(4,4'-диметокситритил)-О-ацетил)амин]-3-тиминил-L-пропан-1-О-(N,N-диизопропил)

- β -цианэтилфосфорамидит (27): 2-[(β -(4,4'-диметокситритил)-О-ацетил) амин]-3-тиминил-L-пропанол 26 (1,00г, 2,09ммоль) сушили в течение ночи в вакууме над твердым NaOH, затем растворили в сухом CH_2Cl_2 (50мл). Раствор охладили до 0°C в аргоновой атмосфере. К этому холодному раствору при перемешивании добавили N,N-диизопропилэтиламин (0,54г, 4,2ммоль), затем 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (0,73г, 3,1ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при 0°C и в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавили CH_2Cl_2 (100мл) и промыли органический слой 5% раствором NaHCO_3 (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Экстракт в CH_2Cl_2 высушили, выпарили досуха и получили маслянистый остаток. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с CH_2Cl_2 - > EtOAc, содержащим 0,1% TEA, в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили пену. Пену сушили в течении ночи над твердым NaOH в вакууме. Высушенную пену растворили в сухом CH_2Cl_2 (10мл) и каплями в течение 30 минут добавляли в перемешиваемый сухой гексан (800мл) в аргоновой атмосфере. После этого образовавшийся осадок перемешивали еще в течение 30 минут, затем отфильтровали, промыли сухим гексаном (100мл) и сушили полученное твердое вещество в вакууме над твердым NaOH в течение 4 часов. Выход: 1,3г (82%).

Пример 29 (фиг. 29)

N_3 -трет-бутилоксикарбонил-О-бензилгидроксиламин (28): О-бензил-гидроксиламин гидрохлорид (15,9г, 100ммоль) взвесили в смеси тетрагидрофурана (150мл) и воды (50мл). К этому раствору при перемешивании добавили TEA (15,15г, 150ммоль), затем ди-трет-бутилдикарбонат (23,98г, 110ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов, затем выпарили досуха. Остаток разделили между EtOAc (250мл) и водой (200мл) и экстрагировали EtOAc. Экстракт в EtOAc промыли гидросульфатом калия (100мл) и соляным раствором (100мл), высушили, выпарили досуха и получили 15г (91%) прозрачного масла.

1-хлор-2-(тетрагидропиранил)окси-этан (29): 1-хлор-этанол (8,06г, 100ммоль) растворили в сухом CH_2Cl_2 (100мл) и охладили до 0°C на ледяной бане в аргоновой атмосфере. К этому раствору при перемешивании добавили дигидропиран (12,6г, 150ммоль), затем пиридиний-p-толуол-4-сульфонат (1,25г, 5ммоль) и продолжали перемешивание в течение ночи. Реакционную смесь выпарили досуха и растворили в EtOAc (200мл). Экстракт в EtOAc промыли 5% раствором NaHCO_3 (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (100мл). Органический экстракт высушили и выпарили досуха. Сырой материал очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с гексаном - > CH_2Cl_2 в качестве элюента. Чистые фракции собрали, выпарили и получили 1г (67%) чистого продукта.

N-трет-бутилоксикарбонил-N-[(тетрагидропиранил)окси]этил-О-бензилгидроксиламин (30): К раствору N_3 -трет-бутилоксикарбонил-О-бензилгидроксиламина 28 (5,79г, 25,96ммоль) в сухом N,N-диметилформамиде (50мл) при перемешивании медленно, в течение 15 минут, при 0°C в аргоновой атмосфере добавили NaN (60%, 1,2г, 30ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 минут и при комнатной температуре в течение часа. Добавили 1-хлор-2-(тетрагидропиранил) окси-этан 29 (4,95г, 30ммоль) и подогревали реакционную смесь до 80°C в течение 12 часов. Реакционную смесь охладили и выпарили досуха. Остаток взвесили в воде (50мл), довели pH раствора до 7 и экстрагировали его EtOAc (150мл). Экстракт в EtOAc промыли водой и соляным раствором, высушили и выпарили досуха. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с гексаном - > CH_2Cl_2 в качестве элюента. Требуемые фракции соединили, выпарили и получили 6,0г (66%) маслянистого продукта. ^1H ЯМР (COCl_3) : δ 1,48 (s, 9H, Boc), 1,49 - 1,84 (m, 6H, 3. CH_2), 3,48 - 3,70 (m, 4H, 2. CH_2), 3,86 (m, 2H, CH_2), 4,60 (t, 1H, CH) , 4,84 (s, 2H, CH_2Ph) и 7,32 - 7,42 (m, 5H, Ph).

N-трет-бугрилоксикарбонил-N-[(2-гидрокси) этил]-О-бензилгидроксиламин (31): раствор N-трет-бутилоксикарбонил-N-[(тетрагидропиранил)окси]этил-О-бензилгидроксиламина 30 (3,51г, 10ммоль) в тетрагидрофуране:воде:AcOH (1 : 1 : 1, 100мл) при перемешивании подогревали до 70°C в течение 3 часов. Реакционную смесь охладили до 0°C и довели pH смеси до 7 при помощи твердого NaHCO_3 . Реакционную смесь экстрагировали в EtOAc (2 x 75мл). Соединенный органический экстракт промыли водой (100мл) и соляным раствором (100мл), высушили и выпарили досуха. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с CH_2Cl_2 - > EtOAc в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили 2,5г (94%) пены. ^1H . ЯМР (CDCl_3) : δ 1,48 (s, 9H, Boc), 3,60 (t, 2H, CH_2) , 3,74 (m, 2H, CH_2), 4,84 (s, 2H, CH_2Ph) и 7,32 - 7,42 (m, 5H, Ph).

N-трет-бутилоксикарбонил-N-[(2-изобутирил) окси] этил]-О-бензилгидроксиламин (32): к раствору N-трет-бутилоксикарбонил-N-[(2-гидрокси)этил]-О-бензилгидроксиламина 31 (4,2г, 16,6ммоль) в сухом пиридине (50мл) при перемешивании добавили TEA (2,02г, 20ммоль), затем изомасляный ангидрид (3,16г, 20ммоль) при комнатной температуре в аргоновой атмосфере. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов, затем выпарили досуха. Остаток растворили EtOAc (200мл) промыли 5% раствором NaHCO_3 (100мл), водой и соляным раствором (50мл). Органический экстракт высушили и выпарили

досуха. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с CH_2Cl_2 в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили 4,5г (80%) чистого соединения. ^1H ЯМР (CDCl_3): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_3), 1,48 (s, 9H, Boc), 2,44 (m, 1H, IbCH), 3,60 (t, 2H, CH_2), 3,74 (m, 2H, CH_2), 4,84 (s, 2H, CH_2Ph) и 7,32 - 7,42 (m, 5H, Ph).

N-(тиминилацетил)-N-[(2-изобутирил)окси]этил]-О-бензилгидроксиламин (33):

N-трет-бутилоксикарбонил-N-[(2-изобутирил) окси] этил]-О-бензилгидроксиламин 32 (5,0г, 14,84ммоль) растворили в CH_2Cl_2 (10мл) и перемешивали в трифторуксусной кислоте (12мл) в течение 30 минут. Реакционную смесь выпарили досуха и растворили в сухом метаноле (10мл). Смесь снова выпарили досуха-и сушили в течение ночи в вакууме над твердым NaOH. Высушенный материал в этом же виде, без исследования, использовали в следующей реакции.

Тиминуксусную кислоту 5 (3,13г, 17ммоль) растворили в сухом N,N-диметилформамиде (75мл) и охладили до -20°C в аргоновой атмосфере. К этому холодному раствору при перемешивании добавили N-метилморфолин (2,02г, 20ммоль), затем изобутил хлорформат (2,72г, 20ммоль). После 15-минутного перемешивания раствор упомянутой соли трифторуксусной кислоты в сухом N,N-диметилформамиде (50мл) нейтрализовали N-метилморфолином (2,02г, 20ммоль) и немедленно, в один прием, добавили к холодному перемешиваемому раствору тиминуксусной кислоты. Реакционную смесь перемешивали при -20°C в течение 1 часа, нагрели до комнатной температуры и продолжали перемешивание в течение ночи. Раствор выпарили досуха, а остаток растворили в CH_2Cl_2 (250мл) и воде (100мл) и экстрагировали CH_2Cl_2 -Органический экстракт промыли 5% раствором NaHCO_3 (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Экстракт в CH_2Cl_2 высушили, выпарили досуха и получили 4,0г (70%) чистого продукта. Чистый продукт кристаллизовали из CH_2Cl_2 /гексана, точка плавления $185 - 188^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$): δ 1,00 (d, 6H, IbCH_3), 1,74 (s, 3H, CH_3), 2,44 (m, 1H, IbCH), 3,92 (m, 2H), 4,18 (t, 2H), 4,68 (bs, 2H), 4,98 (s, 2H), 7,34 (s, 1H, C_6H), 7,40 - 7,50 (m, 5H, Ph) и 11,32 (bs, 1H, NH).

Пример 30 (фиг. 30)

(2R, 4R)-2-карбометокси-4-гидроксипирролидин (35): сухой метанол (40мл) поместили в колбу с круглым дном емкостью 250мл, снабженную магнитной мешалкой и парциальным конденсатором горячего орошения, и охладили на ледяной бане в аргоновой атмосфере. К этому раствору при перемешивании добавили ацетилхлорид (4,32г, 55ммоль), затем цис-4-гидрокси-D-пролин 34 (5,00г, 38,17ммоль). Полученный раствор кипятили в течение 7 - 8 часов, затем охладили до комнатной температуры. Раствор разбавили эфиром, полученное белое твердое вещество отобрали посредством отсасывания, промыли эфиром и высушили в вакууме над твердым NaOH. Выход: 6,9г (100%). ^1H ЯМР (CDCl_3): 2,09 (2 dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,49 - 3,73 (m, 3H), 3,79 (s, 3H, CH_3), 4,34 (m, 2H).

(2R,4R)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-карбомеаюкси-4-гидроксипирролидин (36): к раствору (2R, 4R)-2-карбометокси-4-гидроксипирролидина 35 (6,9г, 38,12ммоль) в тетрагидрофуране/воде (8 : 2, 150мл) при перемешивании добавили TEA (10,1г, 100ммоль), затем ди-трет-бутилдикарбонат (10,9г, 50ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов, затем выпарили досуха. Остаток растворили в EtOAc (200мл) и промыли 0,5N гидросульфатом калия (50мл), водой (100мл) и соляным раствором (50мл). Органический экстракт высушили над Na_2SO_4 , выпарили досуха и получили 7,8г (84%) маслянистого продукта. Из маслянистого продукта после высушивания получили бесцветное твердое вещество, точка плавления $75 - 77^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР (CDCl_3): 1,45 (s, 9H, Boc), 2,09 (2 dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,49 - 3,73 (m, 3H), 3,79 (s, 3H, CH_3), 4,34 (m, 2H).

(2R,4R)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-гидроксимеотил-4-гидроксипирролидин (37): (2R, 4R)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-карбометокси-4-гидроксипирролидин 36 (7,0г, 28,6ммоль) растворили в сухом тетрагидрофуране (100мл) и охладили на ледяной соляной бане в аргоновой атмосфере. К этому холодному раствору добавили борогидрид лития (1,88г, 85,8ммоль) малыми порциями в течение 15 минут. После добавления борогидрида лития реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа, затем при комнатной температуре в течение 15 часов в аргоновой атмосфере. Смесь охладили до $^\circ\text{C}$ и разбавили водой (50мл), затем при помощи AcOH довели pH до 6. Реакционную смесь выпарили досуха и растворили в EtOAc (200мл), промыли водой (100мл) и соляным раствором (100мл). Экстракт в EtOAc высушили и выпарили досуха. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на колонке с силикагелем, с CH_2Cl_2 - > EtOAc в качестве элюента. Чистые фракции собрали и выпарили досуха. Получили 5,00г (81%) прозрачного масла. Маслу дали постоять и получили бесцветное твердое вещество, температура плавления $95 - 97^\circ\text{C}$. ^1H ЯМР (CDCl_3): 1,45 (s, 9H, Boc), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,40 - 3,62 (m, 3H), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H), 4,44 (m, 1H).

(2R,4R)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-(4,4'-диметокситритил)оксиметил-4-гидроксипирролидин (38):

(2R,4R)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-гидроксиметил-4-гидроксипирролидин 37 (4,4г, 20,28ммоль) растворили в сухом пиридине (50мл) и перемешивали в аргоновой атмосфере. К этому раствору при перемешивании добавили TEA (2,53г, 25ммоль), затем 4,4'-диметокситритил хлорид (7,45г, 22ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов, затем погасили MeOH (10мл). Раствор выпарили досуха и растворили в EtOAc (200мл). Слой EtOAc промыли 5% раствором NaHCO_3 (100мл), водой (100мл) и соляным раствором. Органический экстракт высушили над безводным Na_2CO_4 и выпарили досуха. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с гексаном - > EtOAc в качестве элюента. Требуемые фракции соединили, выпарили досуха и получили 8,09г (100%) оранжевой пены. ^1H ЯМР (CDCl_3): 1,45 (s, 9H, Boc), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,40 - 3,62 (m, 3H), 3,74 (s, 6H, 2.0CH_3), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H), 4,44 (m, 1H), 6,82 (d, 4H, Ph) и 7,26 - 8,00 (m, 9H, Ph).

(2R, 4R)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-(4,4'-диметокситритил) оксиметил-4-[(p-толуолсульфонил) окси]

пирролидин (39): (2R,4R)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-(4,4'-диметокситритил)оксиметил-4-гидрокси-пирролидин 38 (8,09г, 20,27ммоль) растворили в сухом пиридине/ CH_2Cl_2 (2 : 1, 200мл) и охладили на ледяной бане в аргоновой атмосфере. К этому холодному раствору добавили TEA (3,03г, 30ммоль), затем р-толуолсульфонил хлорид (5,7г, 30ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 часов и при температуре до 30°C в течение 8 часов. Реакционную смесь выпарили досуха, разделили между EtOAc (200мл) и 5% раствором NaHCO_3 (100мл) и экстрагировали в EtOAc. Экстракт EtOAc промыли водой (100мл) и соляным раствором (100мл), высушили и выпарили досуха. Сырой продукт очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с гексаном - > EtOAc в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили 12,2г (89%) оранжевого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3): 1,45 (s, 9H, Boc), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 2,40 (s, 3H, CH_3), 3,40 - 3,62 (m, 3H), 3,74 (s, 6H, 2.0 CH_3), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H), 4,44 (m, 1H), 6,82 (d, 4H, Ph) и 7,26 - 8,00 (m, 13H, Ph).

(2R, 4S) -1- (трет-бутилоксикарбонил)-2-(4,4'-диметокситритил)оксиметил-4-азил-пирролидин (40): (2R, 4R)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-(4,4'-диметокситритил)оксиметил-4-[(p-толуолсульфонил) окси] пирролидин 39 (5,1г, 7,58ммоль) растворили в диметилформамиде (50мл) и разбавили водой (5мл). К этому раствору при перемешивании добавили азид натрия (0,65г, 10ммоль) и в течение 8 часов подогревали до 80°C. Смесь охладили и выпарили досуха. Остаток разделили между CH₂Cl₂ (200мл) и водой (100мл) и экстрагировали CH₂Cl₂. Органический экстракт промыли соляным раствором (50мл), высушили над Na₂SO₄ и выпарили досуха. Сырой продукт очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с гексаном - > EtOAc в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили 3,8г (92%) прозрачного масла. ¹H ЯМР (CDCl₃): 1,45 (s, 9H, Boc), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,40 - 3,62 (m, 3H), 3,74 (s, 6H, 2.0CH₃), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H), 4,44 (m, 1H), 6,82 (d, 4H, Ph) и 7,26 - 7,80 (m, 9H, Ph).

(2R,4S)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-гидроксиметил-4-амин-пирролидин (41):

(2R,4S)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-(4,4'-диметокситритил)оксиметил-4-азид-пирролидин 40 (2,72г, 5ммоль) в метаноле (75мл) гидрогенизировали в присутствии 10% палладированного угля (0,3г) при комнатной температуре под давлением в 5 атмосфер. Через 12 часов катализатор отфильтровали, промыли метанолом (20мл) и удалили растворитель в вакууме. Выход: 1,0г (93%). ^1H ЯМР (CDCl_3): 1,45 (s, 9H, Boc), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,40 - 3,62 (m, 3H), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H) и 4,44 (m, 1H).

(2R,4S)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-гидроксиметил-4-фталимид-пирролидин (42):

(2R,4S)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-гидроксиметил-4-амин-пирролидин 41 (1,00г, 4,63ммоль) растворили в сухом метаноле (20мл) и обрабатывали N-этоксикарбонил фталимидом (1,09г, 5ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение 6 часов и выпарили досуха. Остаток очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с CH_2Cl_2 -> EtOAc в качестве элюента. Чистые фракции соединили, выпарили и получили 1,5г (94%) чистого продукта в виде пены. ^1H ЯМР (CDCl_3): 1,45 (s, 9H, Bое), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,40 - 3,62 (m, 3H), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H), 4,44 (m, 1H) и 7,3 - 7,6 (m, 4H, Ph).

(2R,4S)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-[N₃-бензоил (тимин-1-ил)]метил-4-фталимид-пирролидин (43): к перемешиваемому раствору N₃-бензоилтимина 20 (1,15г, 5ммоль) в сухом тетрагидрофуране (70мл) в аргоновой атмосфере при комнатной температуре добавили трифенилфосфин (2,62г, 10ммоль) и (2R,4S)-1-(трет-бутилоксикарбонил)-2-гидроксиметил-4-фталимид-пирролидин (1,4г, 4,05ммоль). Через 15 минут медленно, в течение 10 минут, добавили диэтилазодикарбоксилат (1,74г, 10ммоль). Реакционную смесь накрыли алюминиевой фольгой и перемешивали при комнатной температуре в аргоновой атмосфере в течение 24 часов. Растворитель выпарили досуха, а остаток растворили в EtOAc (150мл). Органический экстракт промыли 5% раствором K₂HCO₃ (100мл), водой (100мл) и соляным раствором (100мл), затем высушили над безводным Na₂SO₄. Высушенный экстракт в EtOAc выпарили досуха и получили оранжевое масло. Сырой продукт очистили посредством испарительной хроматографии на силикагеле с гексаном - > EtOAc в качестве элюента. Фракцию, содержащую требуемый продукт, соединили и выпарили. Получили бледно-розовое масло. Выход: 2,0г (89%). ¹H ЯМР (CDCl₃): 1,41 (s, 9H, Boc), 1,72 (s, 3H, CH₃), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,40 - 3,62 (m, 3H), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H), 4,44 (m, 1H), 7,06 (s, 1H, C₆H) и 7,20 - 7,60 (m, 9H, Ph).

Пример 31

Синтез олигонуклеотидов: Олигонуклеотиды, содержащие модифицированные аминокислотные скелеты, были синтезированы в автоматическом синтезаторе ДНК (Applied Biosystems, модель 394) по принципам стандартной фосфорамидитной химии. Бета-цианэтил-фосфорамидиты, реактивы для синтеза и полистироловые колонки CPG были приобретены в компании Applied Biosystems (Foster City, CA). Для синтеза фосфоротиоатных олигонуклеотидов стандартную окислительную колбу заменили тетраэтилтиурам дисульфидом/ацетонитрилом, а для поэтапного тиатирования фосфатных связей применили стандартную фосфоротиоатную программу ABI. После расщепления на колонке из пористого стекла протекторные группы удаляли посредством обработки олигонуклеотидов концентрированным гидроксидом аммония в течение 8 часов при 55°C. Очистку олигонуклеотидов (с группами DMT) проводили посредством жидкостной хроматографии высокого разрешения на полупрепаративной обращенно-фазной колонке C₁₈ (ABI) с линейным градиентом 5% ацетонитрила в 0,1M триэтиламмония ацетате (буфер А) и ацетонитрила (буфер В). Протекторные группы DMT расщепляли посредством обработки 80% уксусной кислотой, а продукт осаждали при помощи этанола. Чистоту соединений проверяли при помощи жидкостной хроматографии высокого разрешения на аналитической колонке C₁₈ (Beckman). Аминокислотные мономеры присоединяли к 3'-концам, 5'-концам и в середине последовательностей ДНК со 100%-ной эффективностью присоединения. Без

6

6.

затруднений приготовили также гомополимер, содержащий 16 модифицированных аминокислотами тиминов.

Пример 32

Анализ гибридизации: Способность олигонуклеотидов, модифицированных аминокислотами, предложенных настоящим изобретением, гибридизоваться с комплементарными им последовательностями РНК и ДНК определяется посредством теплового анализа. РНК-комплемент синтезирован компанией Genset (La Jolla, CA) и очищен посредством денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной. К РНК- и ДНК-комплеентам для образования двойных гибридных структур добавляли в стехиометрических концентрациях природные антисмысловые олигонуклеотиды или олигонуклеотиды, содержащие функциональные группы в определенных местах. Зависимость оптической плотности (260нм) и гиперхромизма от температуры при переходе от двойной структуры к случайной спирали измеряли при помощи ультрафиолетового спектрофотометра Varlan Gary IE UV-Visible. Измерения производились в буфере из 10мМ фосфата натрия, pH 7,4, 0,1мМ ЭДТА и NaCl, обеспечивающем ионную силу либо 0,1М, либо 1,0М. Анализ данных проводили посредством графического представления $1/T_{пл}$ относительно $\ln(Ct)$, где Ct - общая концентрация олигонуклеотидов. Этот анализ позволил определить термодинамические параметры. На основании данных об устойчивости образовавшихся дуплексов или гетеродуплексов оценивали влияние присутствующего в олигонуклеотидах модифицированного пиримидина на устойчивость спирали. Модификациям, значительно изменяющим устойчивость гибрида, соответствует уменьшение или увеличение свободной энергии (дельта G), и на основании этого принимается решение об их использовании в антисмысловых олигонуклеотидах.

Анализ гибридизации проводился с олигонуклеотидами, содержащими аминонуклеиновые скелеты на 3'-концах, а также на 5'-концах. Предварительный анализ показал, что модифицированные олигонуклеотиды образуют дуплексы с комплементарными им последовательностями РНК и ДНК, как и немодифицированные олигонуклеотиды.

Пример 33

Устойчивость по отношению к нуклеазам: Устойчивость природных, фосфоротиоатных и модифицированных олигонуклеотидов, предложенных настоящим изобретением, по отношению к сывороточным нуклеазам оценивали посредством инкубации олигонуклеотидов в средах, содержащих фетальную телячью сыворотку или сыворотку взрослого человека в различных концентрациях. Меченые олигонуклеотиды выдерживают в средах различное время, обрабатывают протеазой К и анализируют посредством электрофореза на 20% полиакриламид-мочевинных денатурирующих гелях с последующей авторадииографией или люминофорной визуализацией. Количественную оценку авторадииограмм проводят посредством лазерной денситометрии. Зная положение модификации и длину олигонуклеотида, можно определить влияние той или иной модификации на деградацию под действием нуклеаз. Для экспериментов с цитоплазматическими нуклеазами была использована клеточная линия HL60. Пост-митохондриальный супернатант готовят посредством дифференциального центрифугирования; меченые олигонуклеотиды выдерживают в этом супернатанте в течение различного времени. Затем деградацию олигонуклеотидов оценивают, как и деградацию под действием сывороточных нуклеаз. Проводится количественная оценка результатов авторадииографии для сравнения немодифицированных, т.е. фосфоротиоатных, олигонуклеотидов с модифицированными.

Предварительный анализ олигонуклеотидов, модифицированных аминокислотами, показал, что они устойчивы к воздействию фосфодиэстеразы из змеиного яда.

Включение посредством ссылки

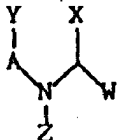
Все патенты, патентные заявки и публикации, упомянутые в настоящем документе, включаются в него посредством ссылки.

Эквиваленты

Приведенное выше описание считается достаточным, чтобы специалист мог внедрить изобретение в практику. Различные модификации описанного выше изобретения, очевидные для специалистов в области молекулярной биологии, органической химии или в родственных областях, включаются в объем нижеследующей формулы изобретения.

Формула винаходу

1. Производные аминокислот или аминоспиртов формулы I в любой из групп I, II



где N обозначает азот,
Группа I

X обозначает CHR_2OH , где R_2 обозначает H, (низший алкил)амин или (низший алкил)имидазол;

Y обозначает $Base-(CH_2)_n-$, где Base обозначает негалогенизированное переменное нуклеозидное основание, где $n = 1 - 7$;

A обозначает карбонил;

Z обозначает H или OR_3 , где R_3 обозначает H, низший алкил, (низший алкил)амин или (низший алкил)

имидазол;

W обозначает CHR_4OH , где R_4 обозначает H, (низший алкил) амин или (низший алкил) имидазол;

Группа II

A обозначает карбонил;

X обозначает $\text{Base}-(\text{CH}_2)_n$, где Base обозначает негалогенизированное переменное нуклеозидное основание, где n- 1 - 3;

Y обозначает $-\text{CH}_2\text{OH}$;

W обозначает $-\text{CH}_2\text{OH}$;

Z обозначает H.

2. Олигонуклеотид, в состав которого включены соединения по п. 1 таким образом, что межнуклеотидные связи находятся между W и X в группе I, W и Y в группе II.

3. Олигонуклеотид по п. 2, где межнуклеотидная связь содержит фосфодиэфир.

4. Олигонуклеотид по п. 2, где межнуклеотидная связь содержит фосфотиоат.

5. Олигонуклеотид по п. 2, где межнуклеотидная связь содержит фосфорамидат.

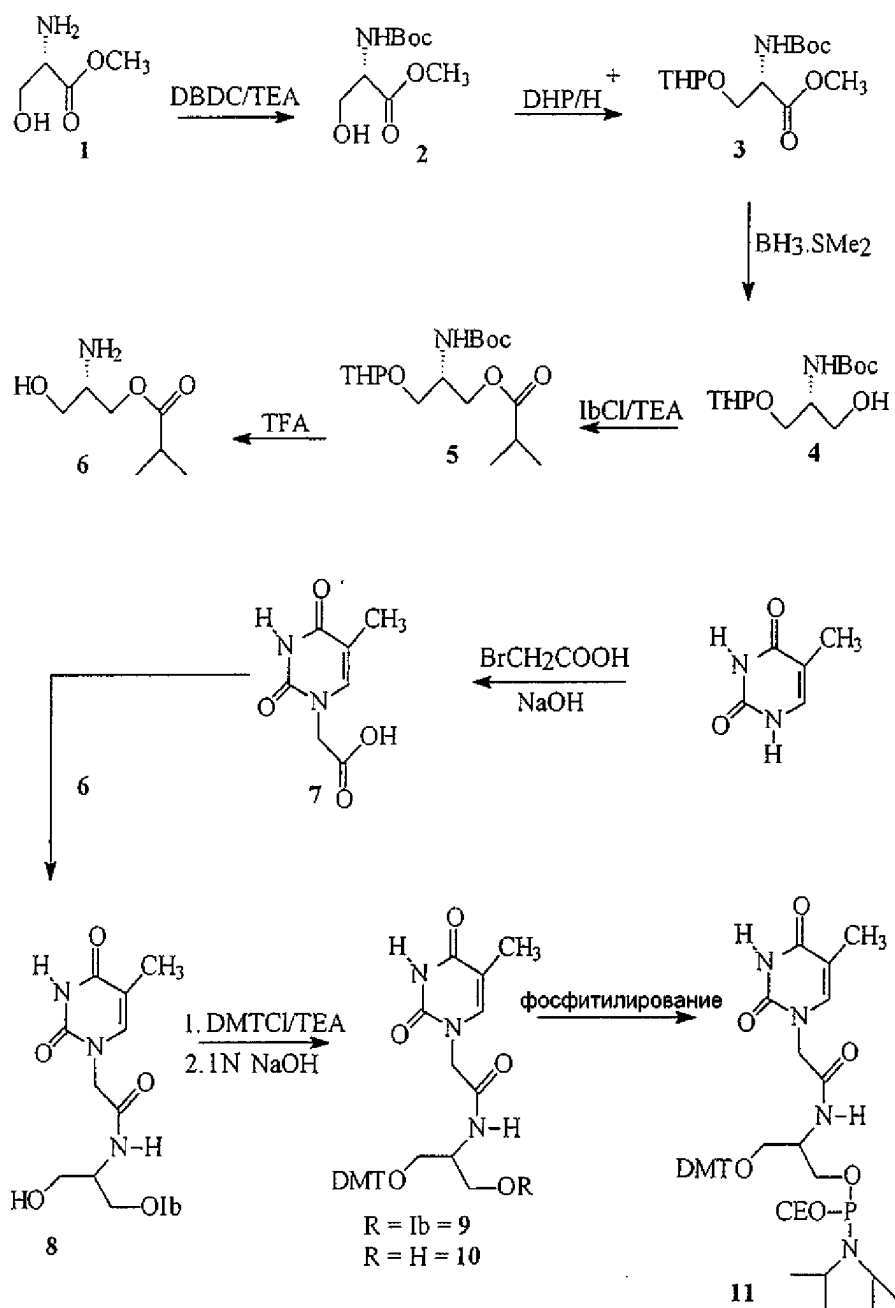
6. Олигонуклеотид по п. 2, где межнуклеотидная связь содержит гидроксамат.

7. Олигонуклеотид по п. 2, в котором различимо множество мономеров, где по меньшей мере один из мономеров содержит 2'-дезоксирибозный нуклеозид, и дополнительно содержит по меньшей мере две различных межнуклеотидных связи из группы, состоящей из фосфодиэфира, фосфотиоата, фосфорамидата и гидроксамата.

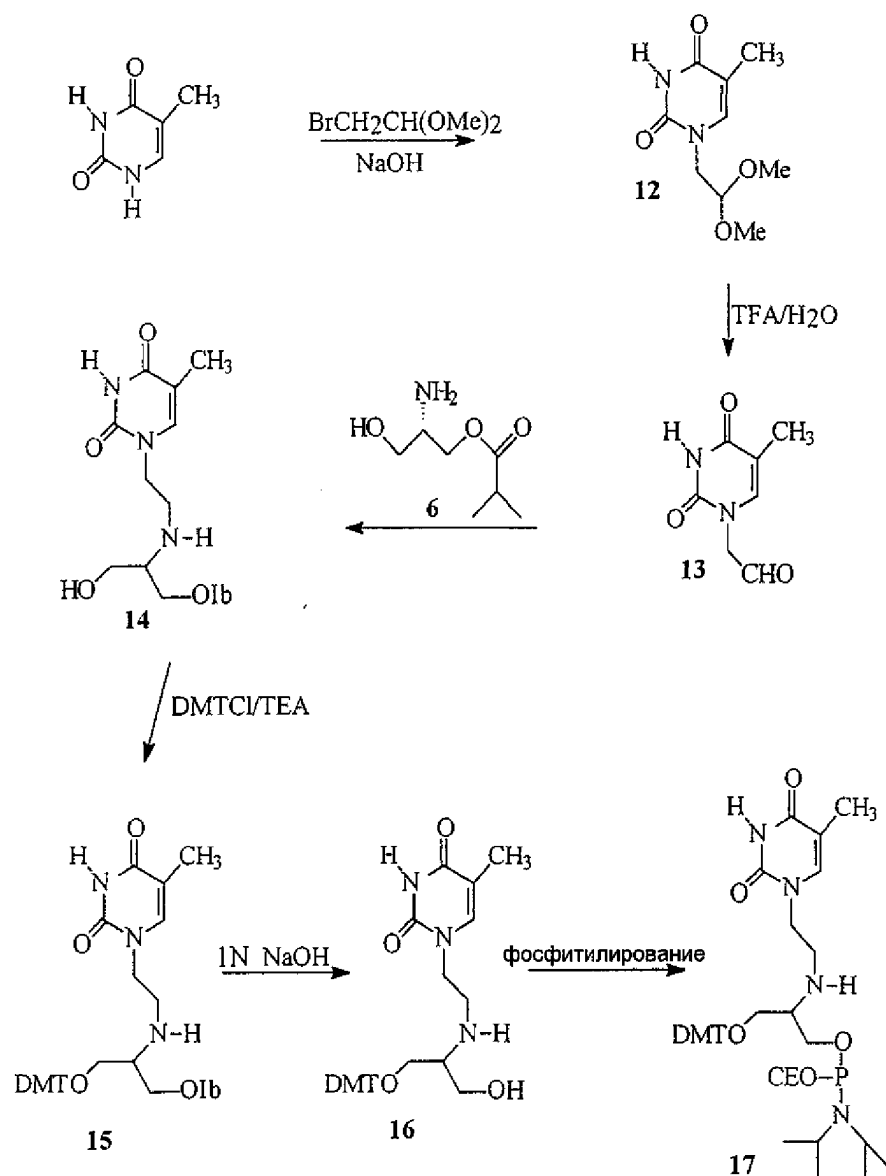
8. Олигонуклеотид по п. 7, который имеет 2'-дезоксирибозонуклеозидное пентафуранозильное кольцо, в котором кольцевой кислород заменен одной из групп S, CH_2 или NR_6 , где R_6 является ацетилом, низшим алкилом, карбонилем, карбонил(низший алкил)амином или карбонил(низший алкил)имидазолом.

U A 4 8 1 5 0 C 2

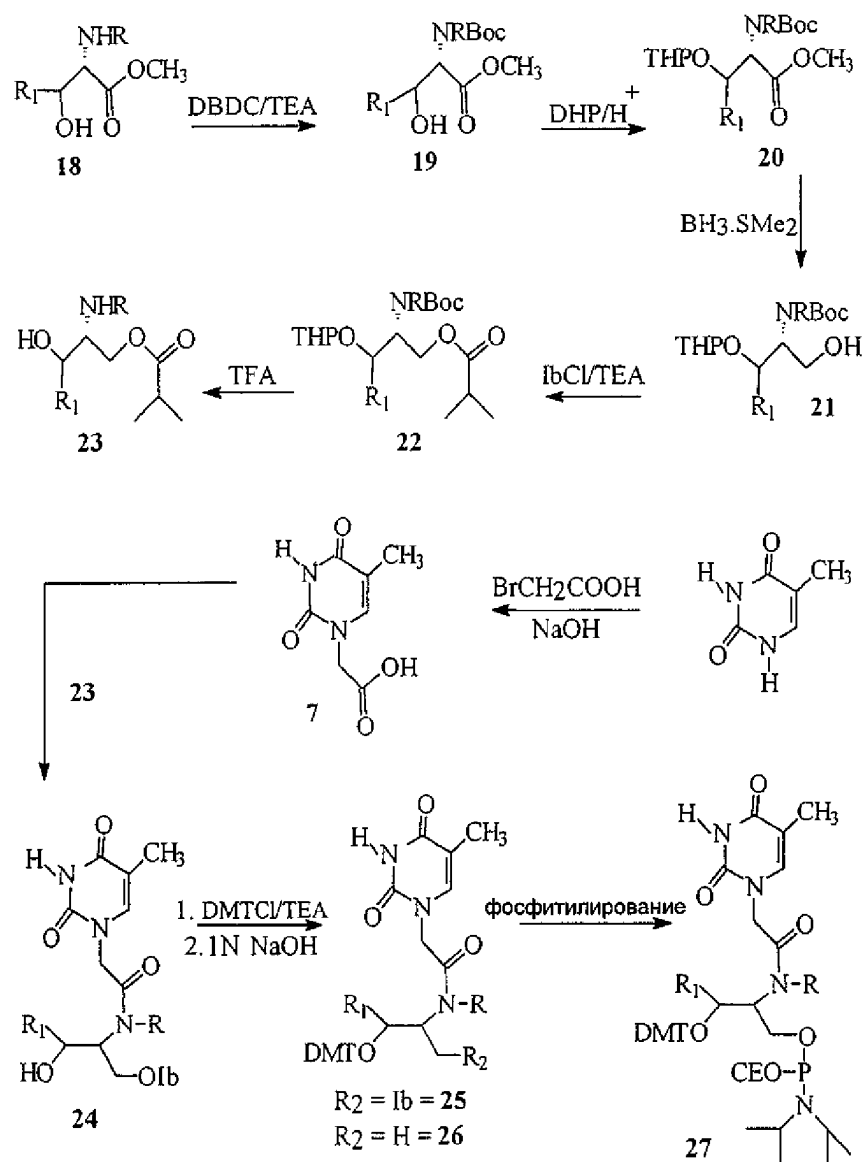
U A 4 8 1 5 0 C 2



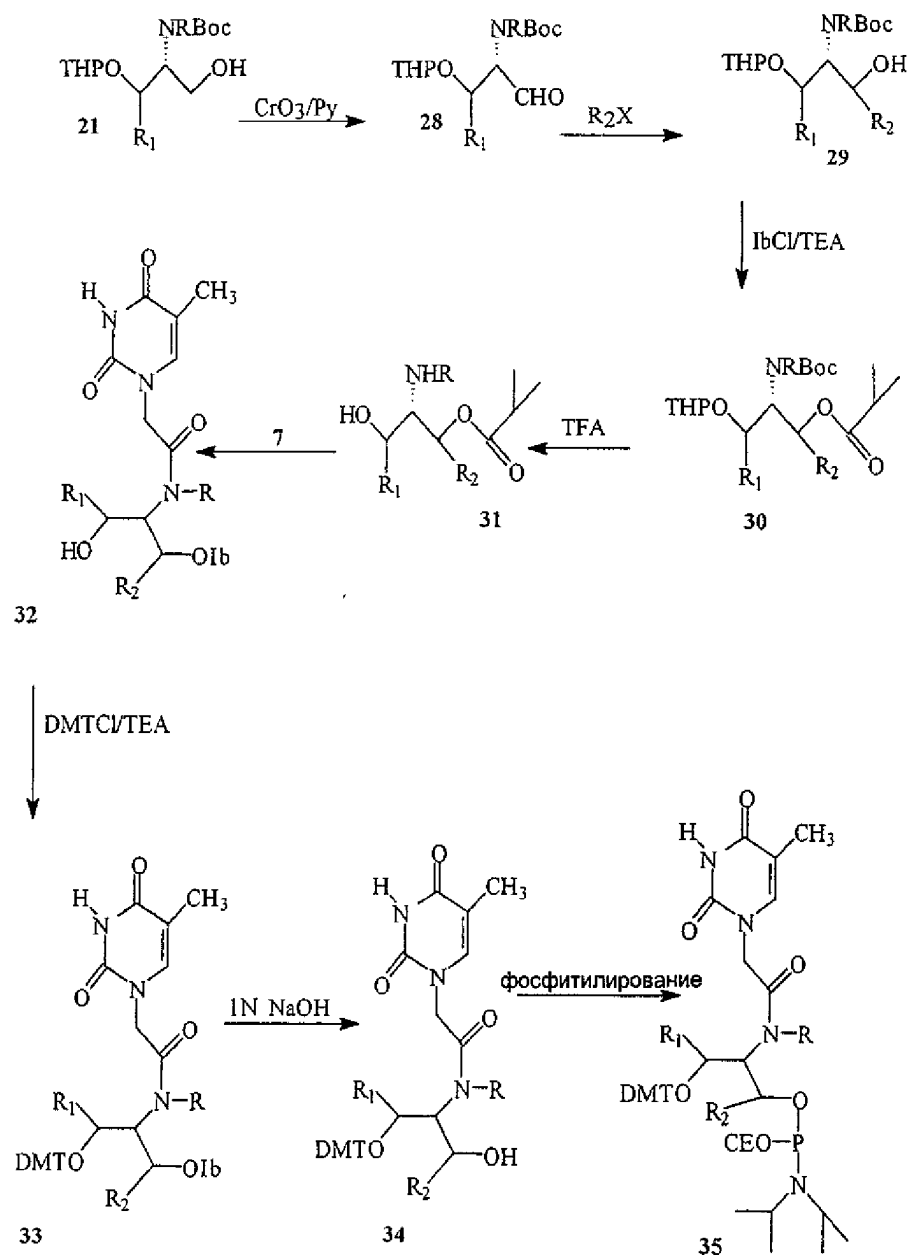
Фиг. 1



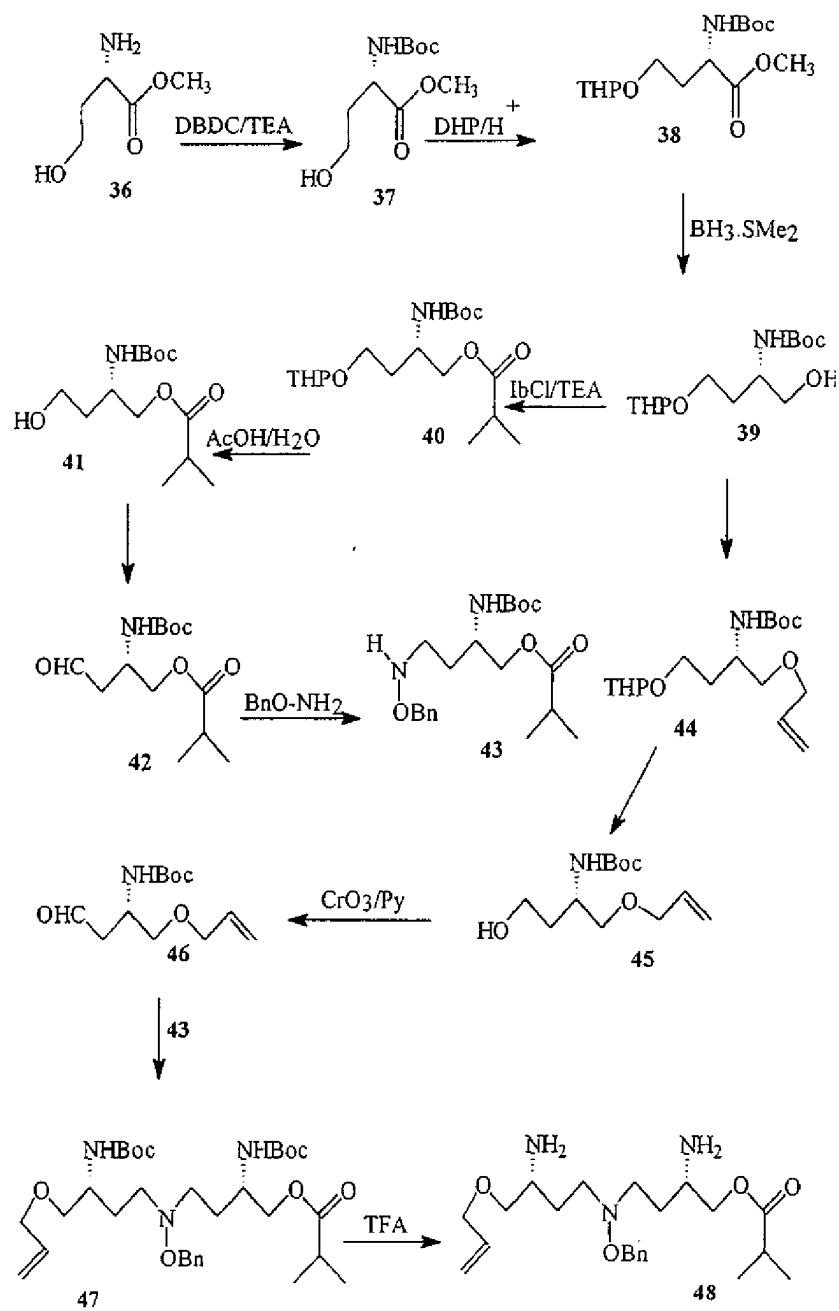
Фиг. 2



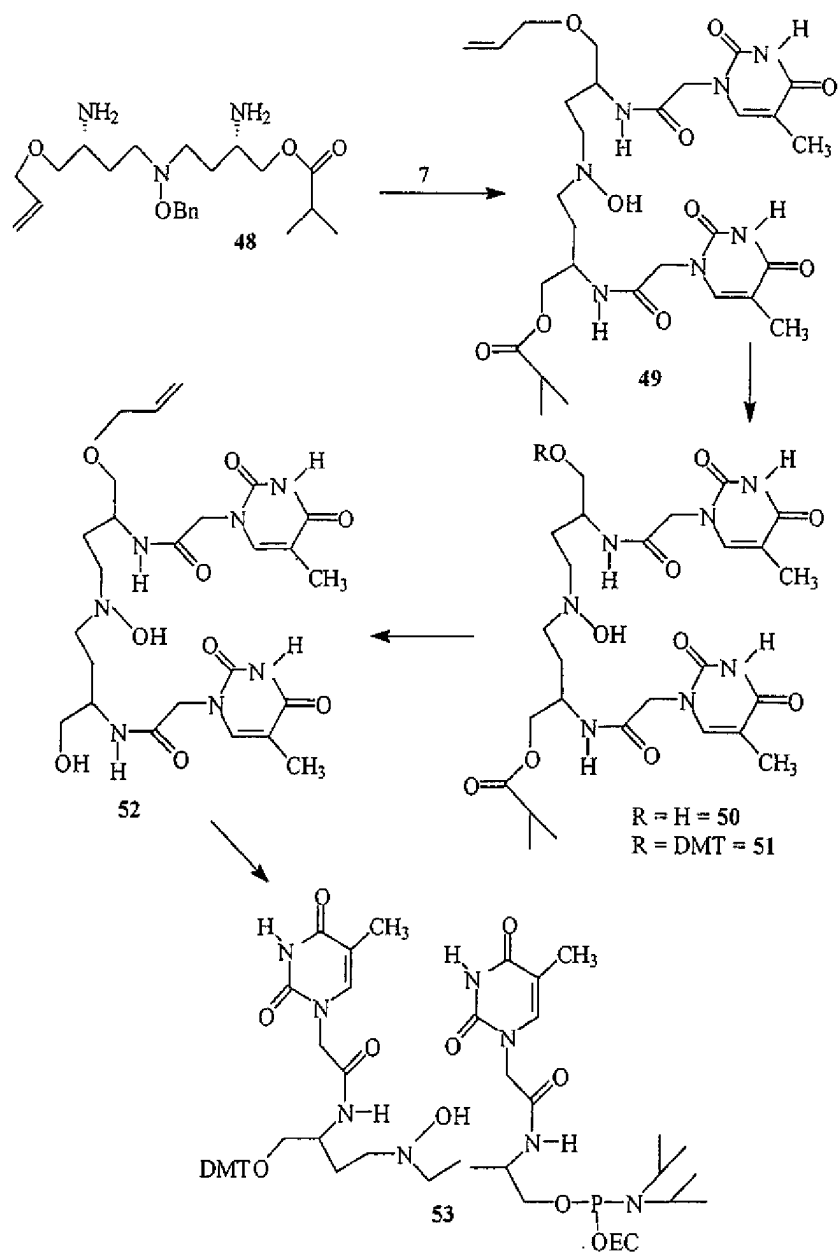
Фиг. 3



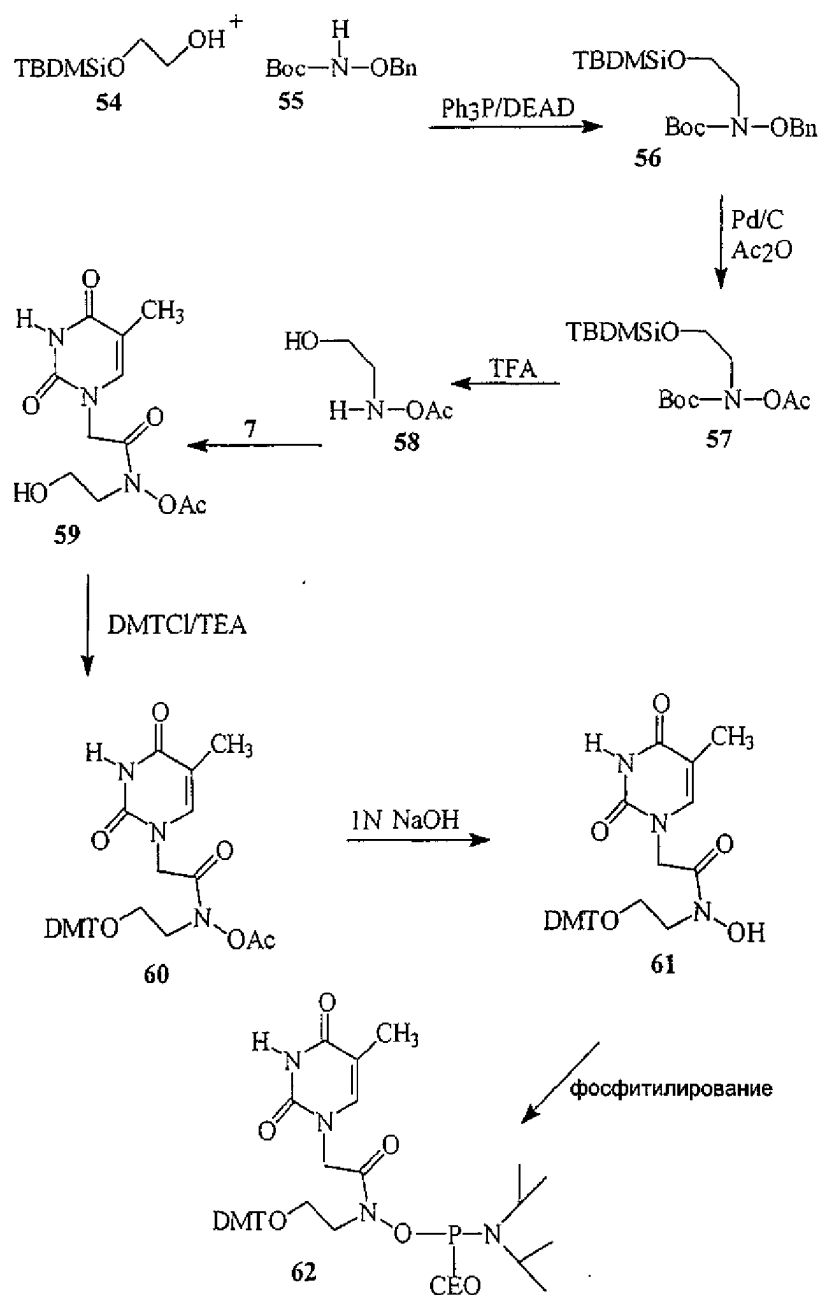
Фиг. 4



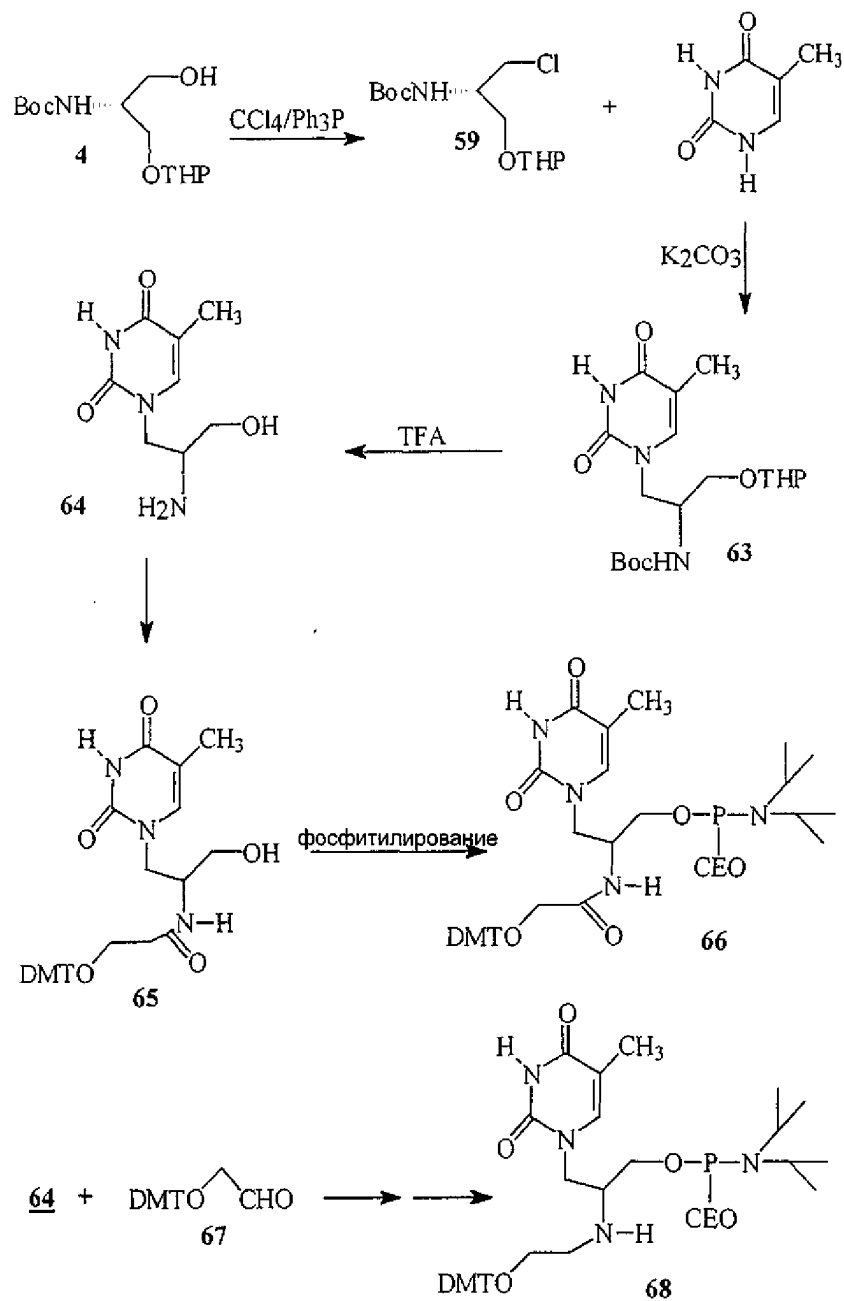
Фиг. 5



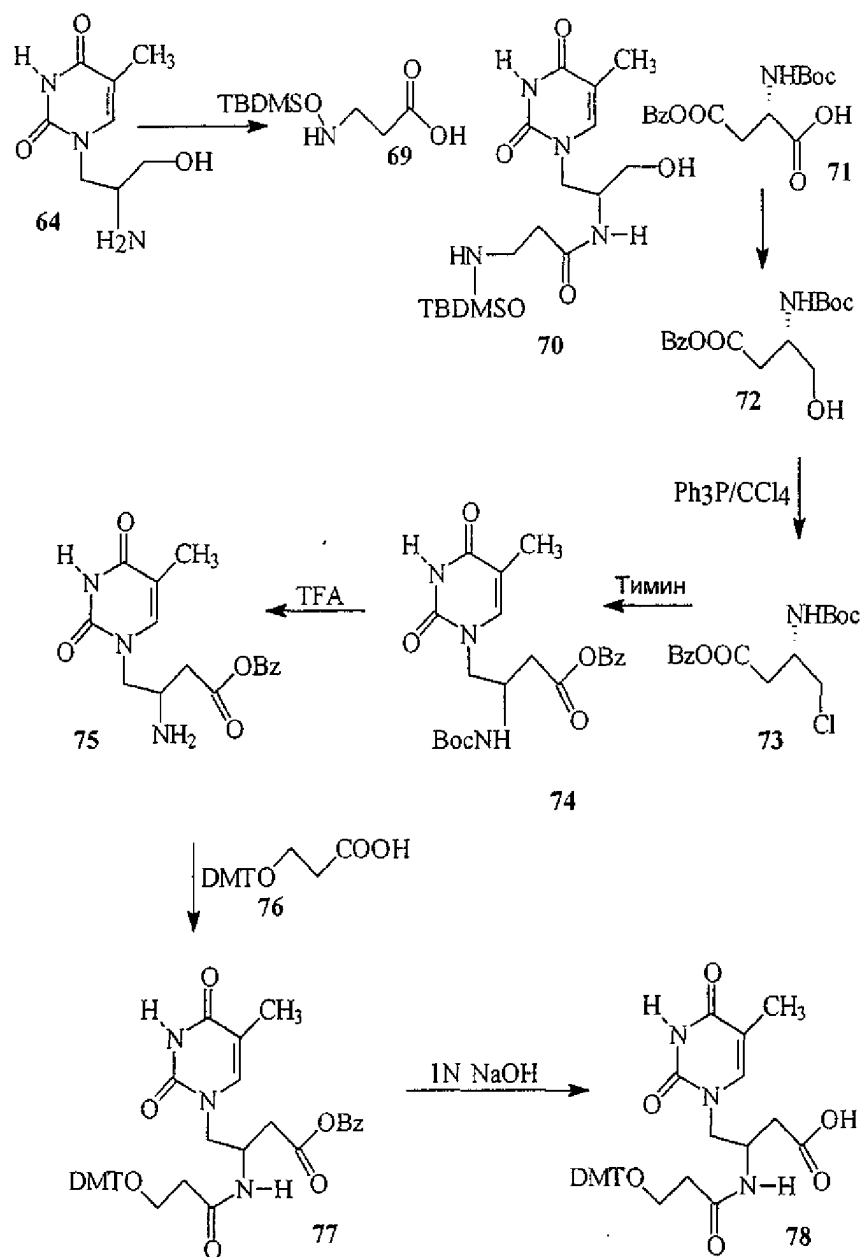
Фиг. 5



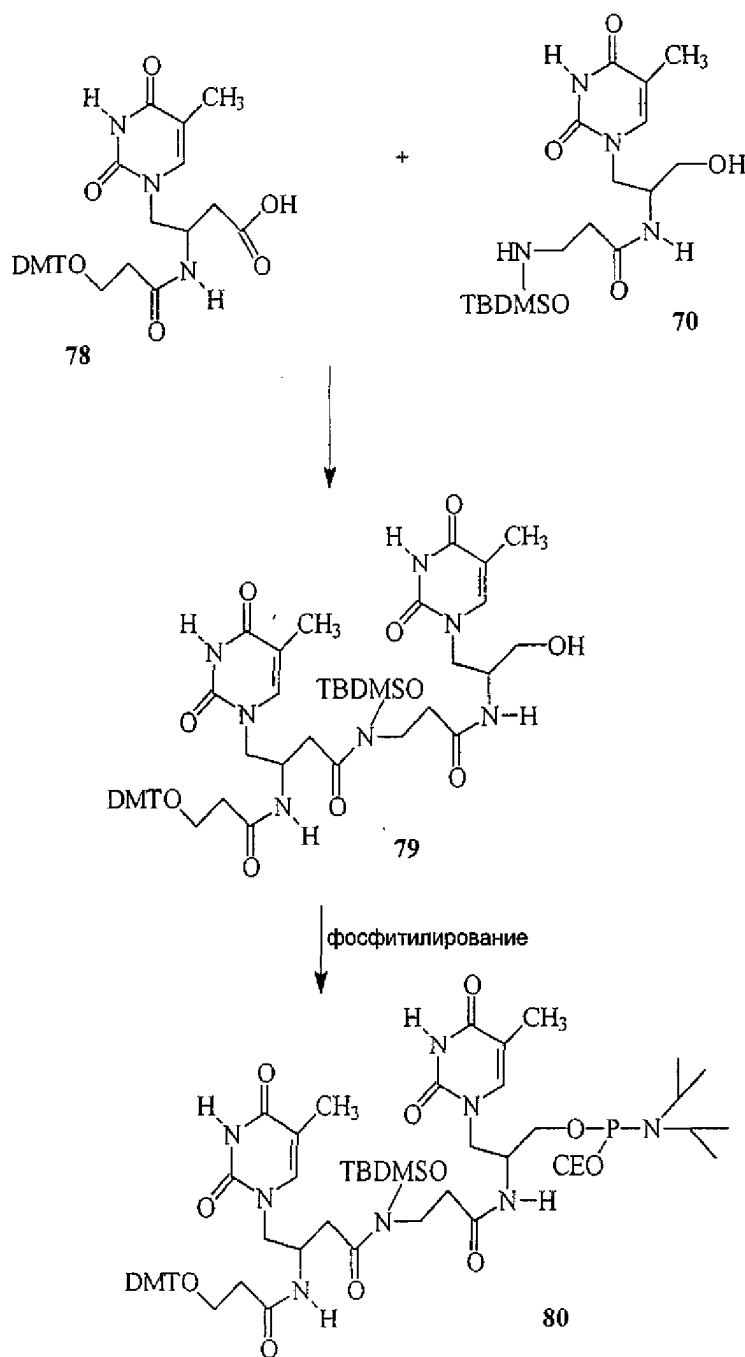
Фиг. 6



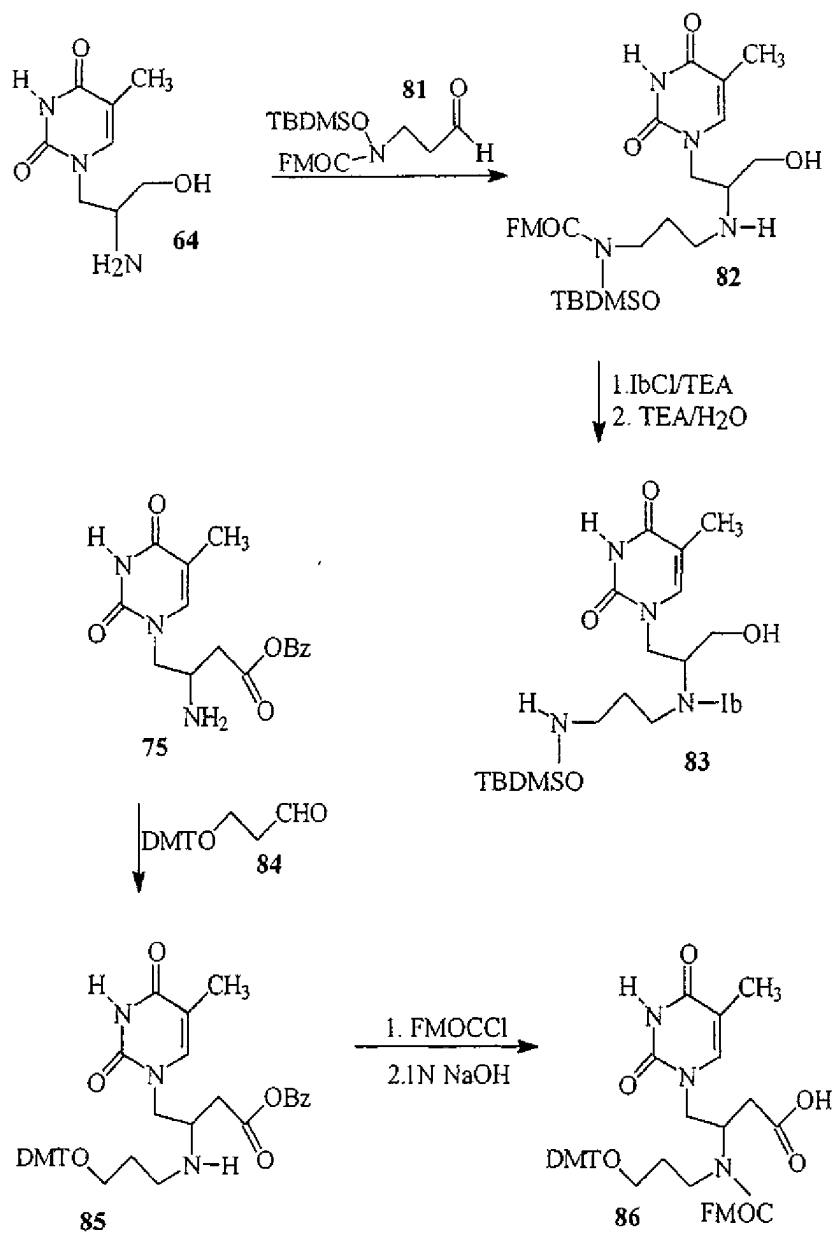
Фиг. 7



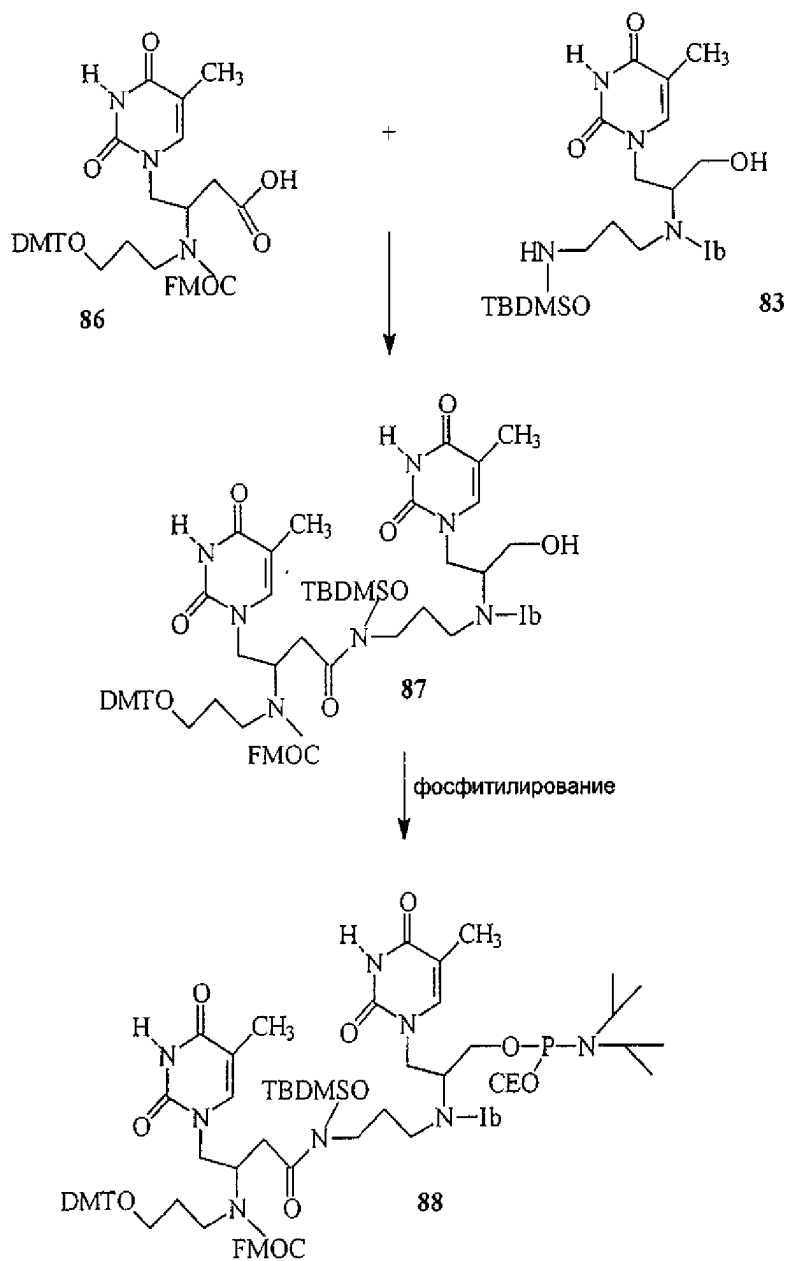
Фиг. 8



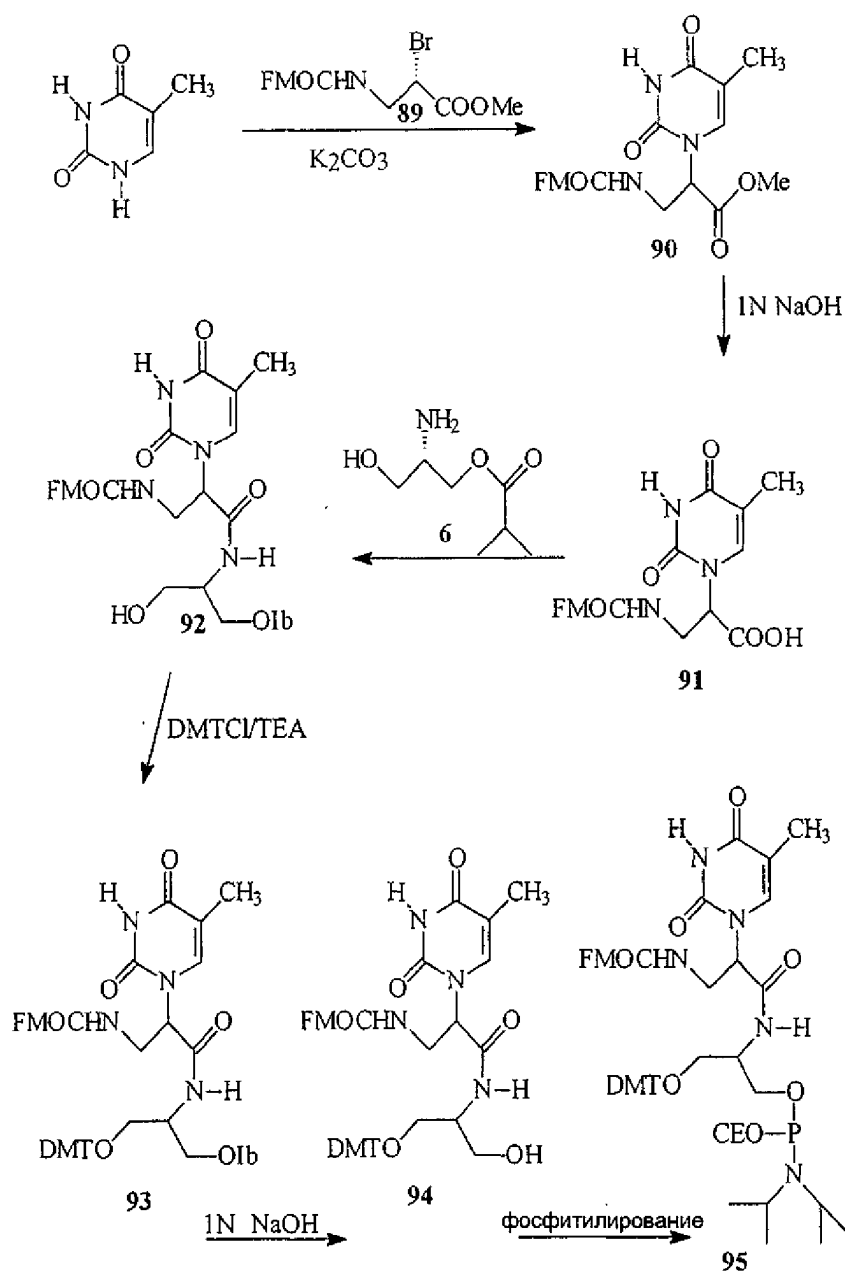
Фиг. 8



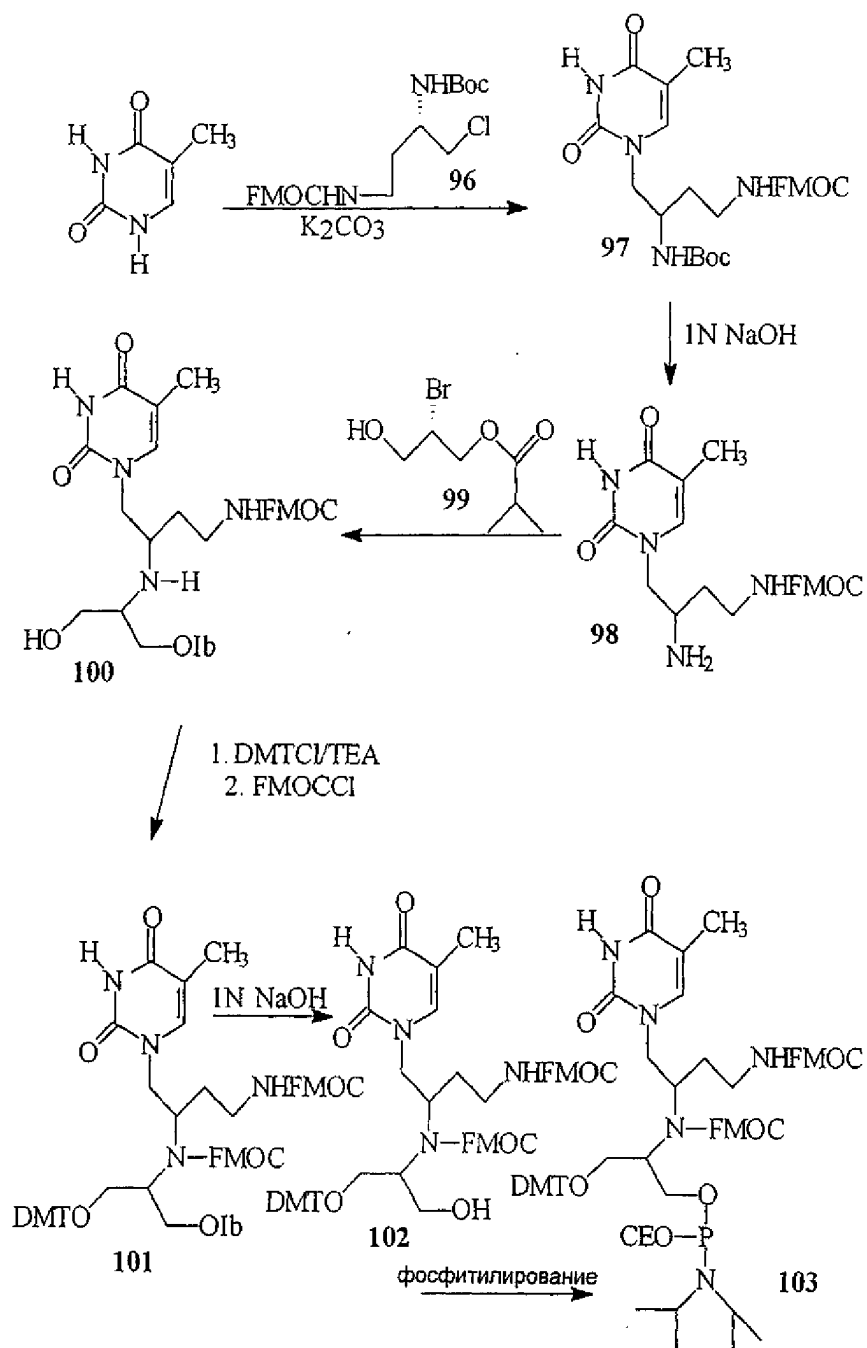
Фиг. 9



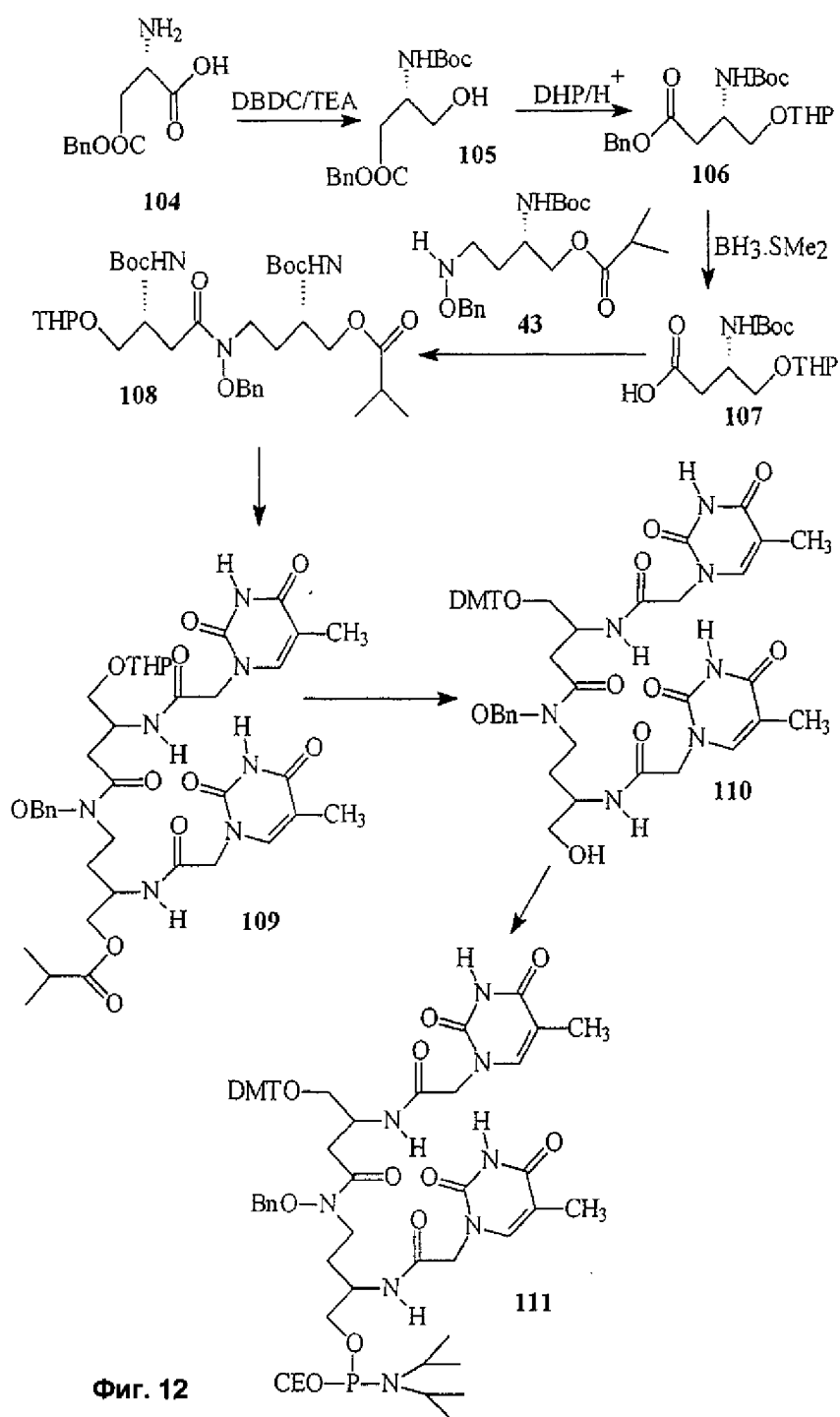
Фиг. 9

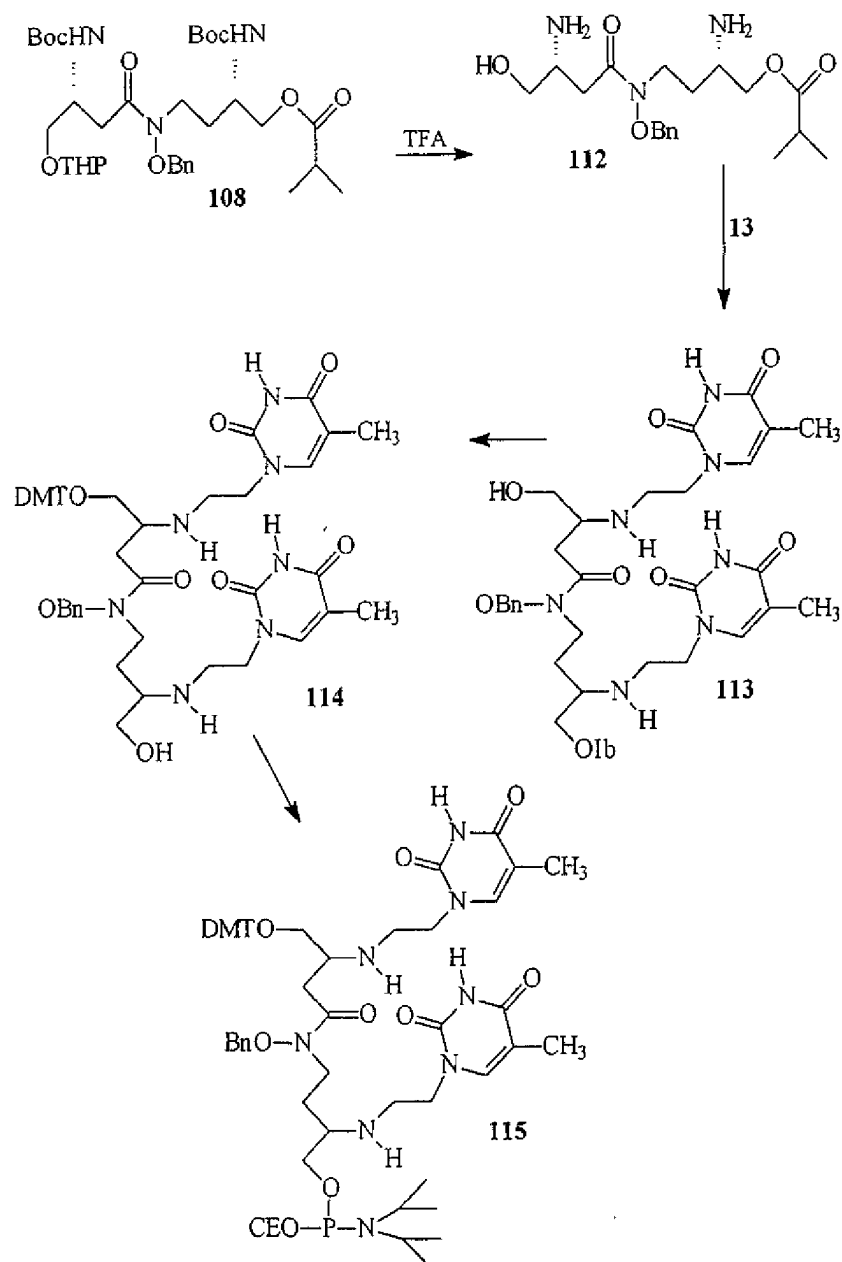


Фиг. 10

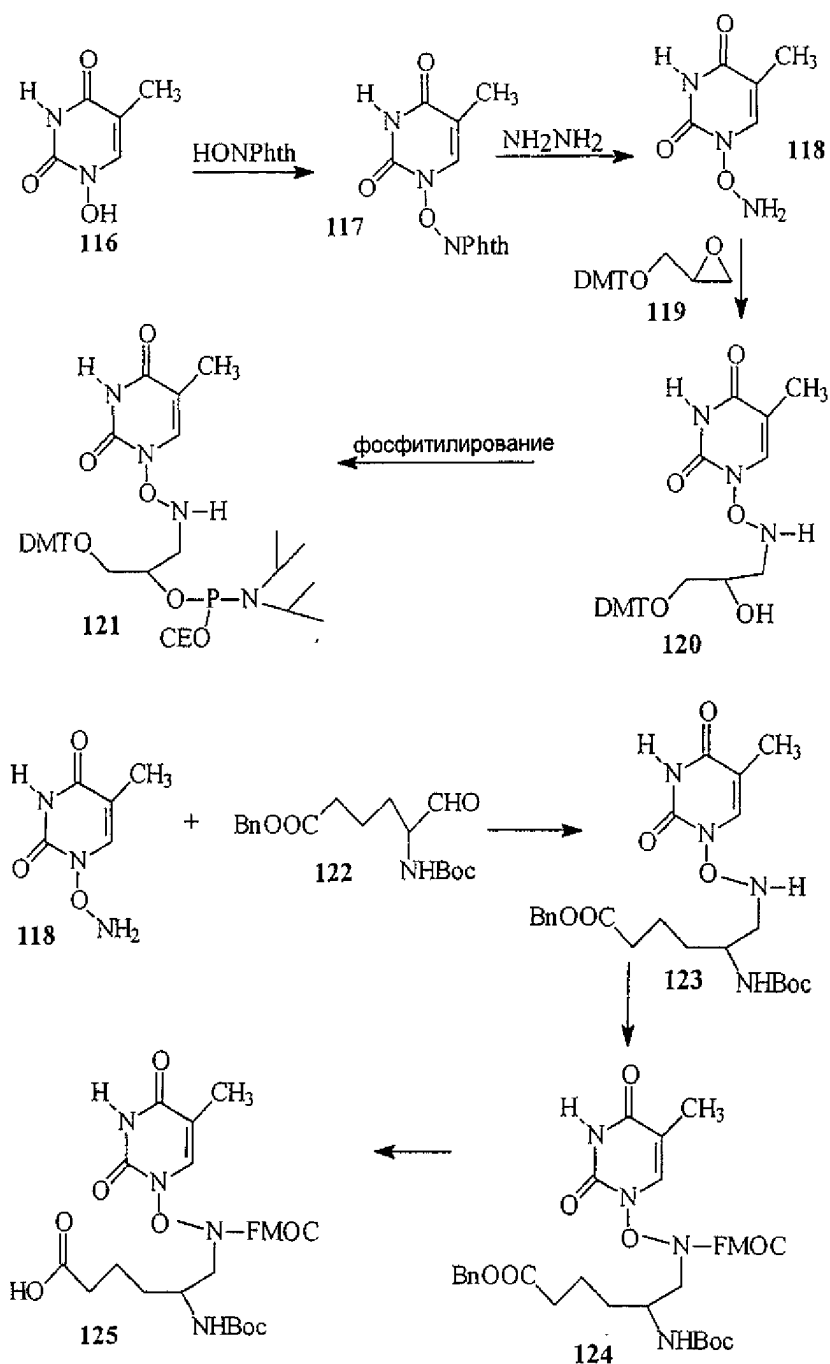


Фиг. 11

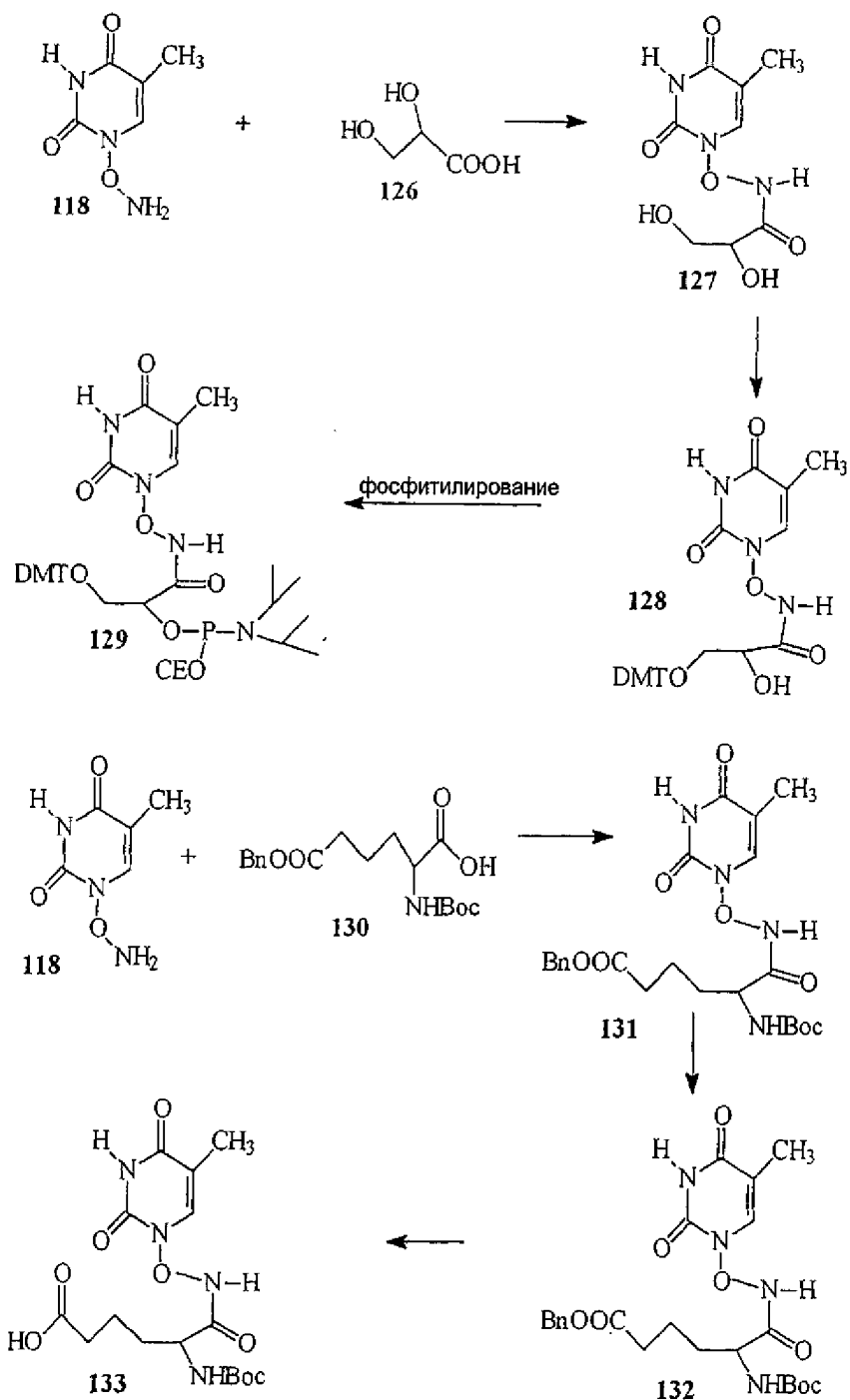




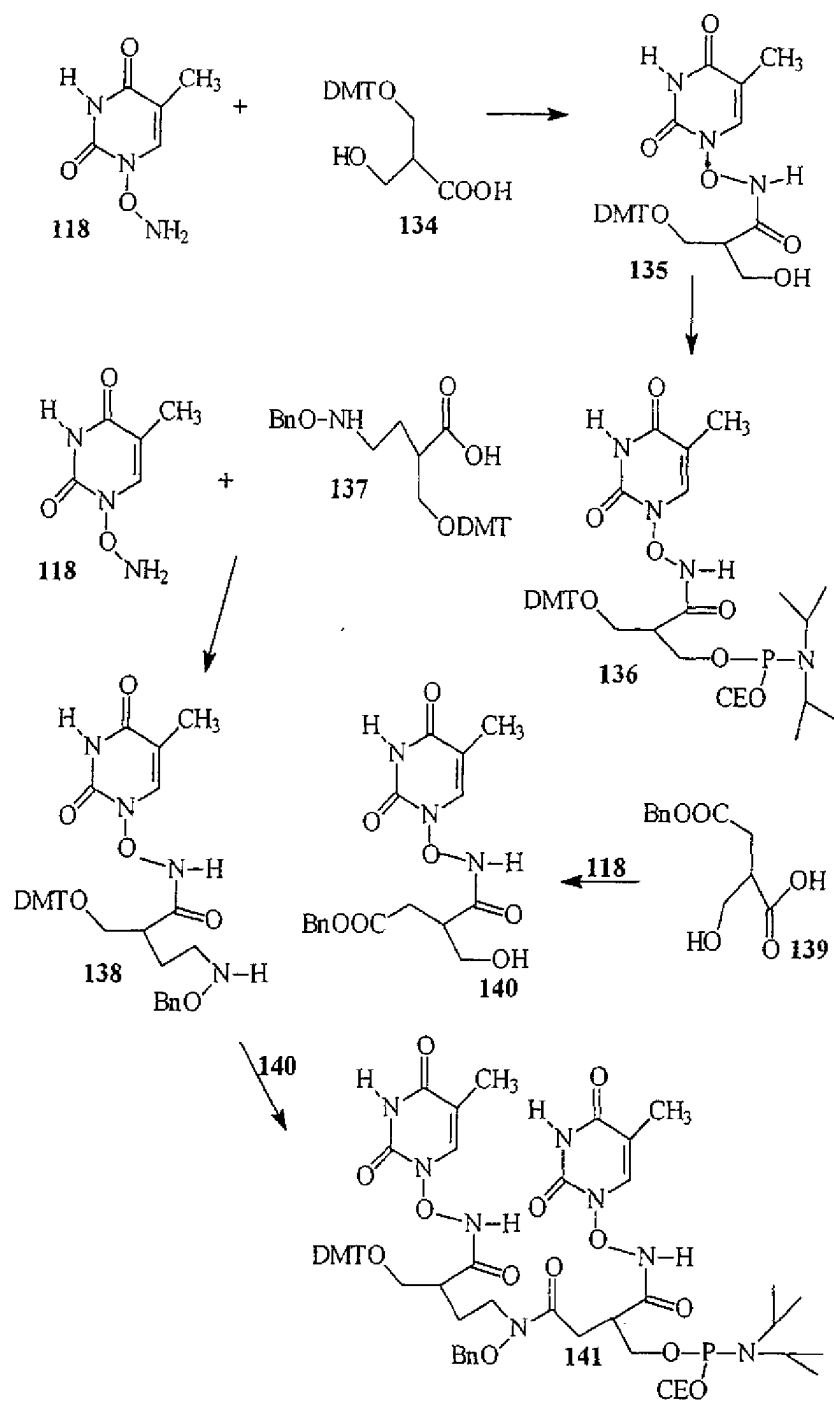
Фиг. 13



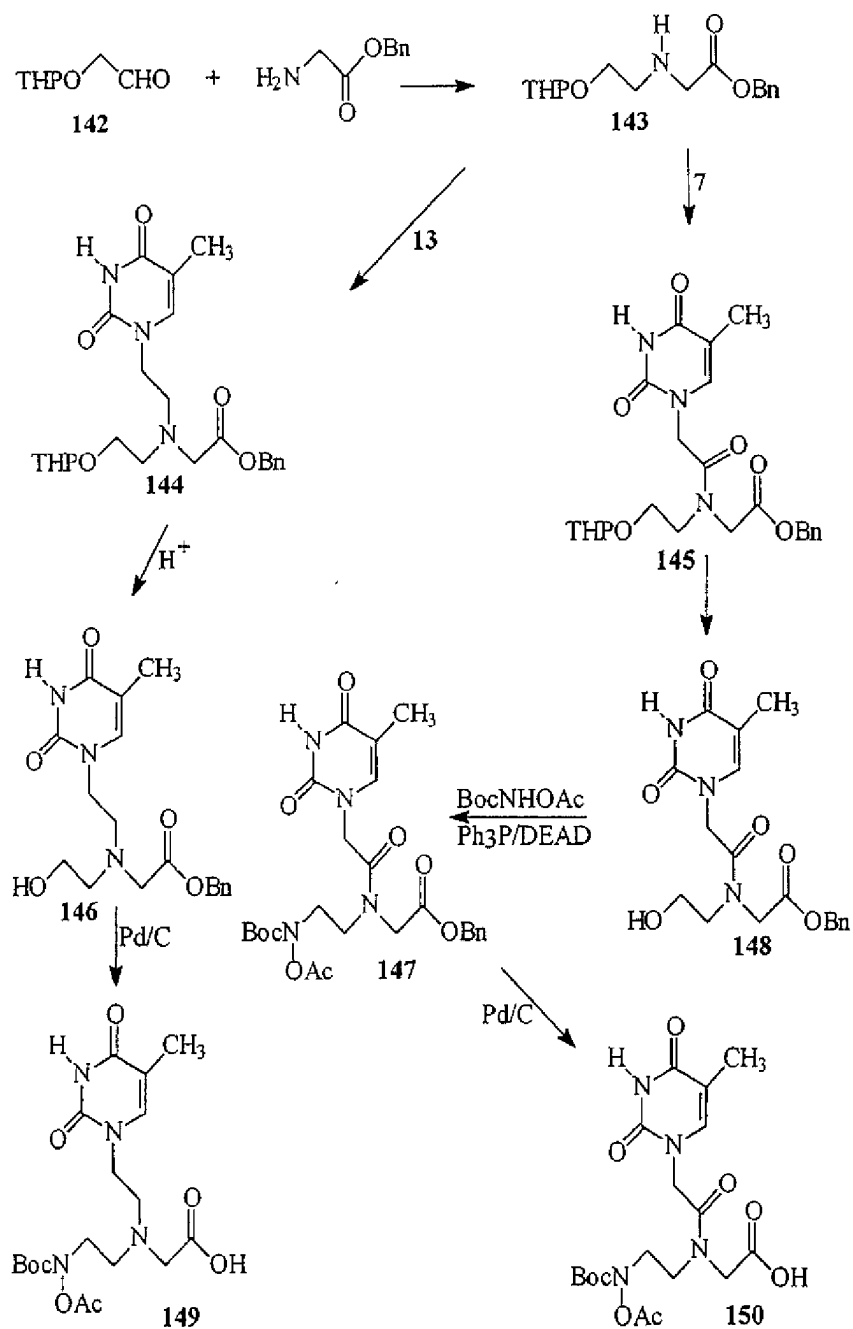
Фиг. 14



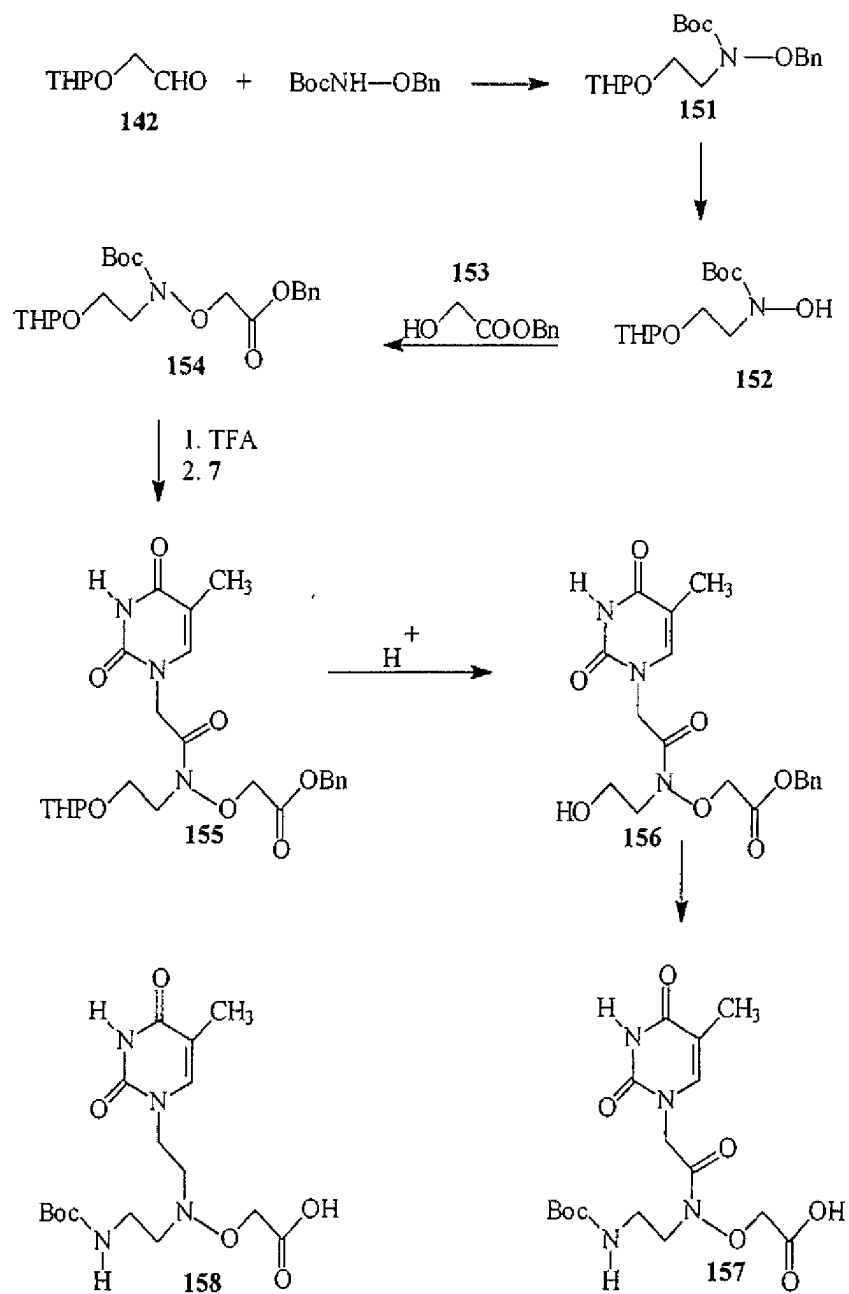
Фиг. 15



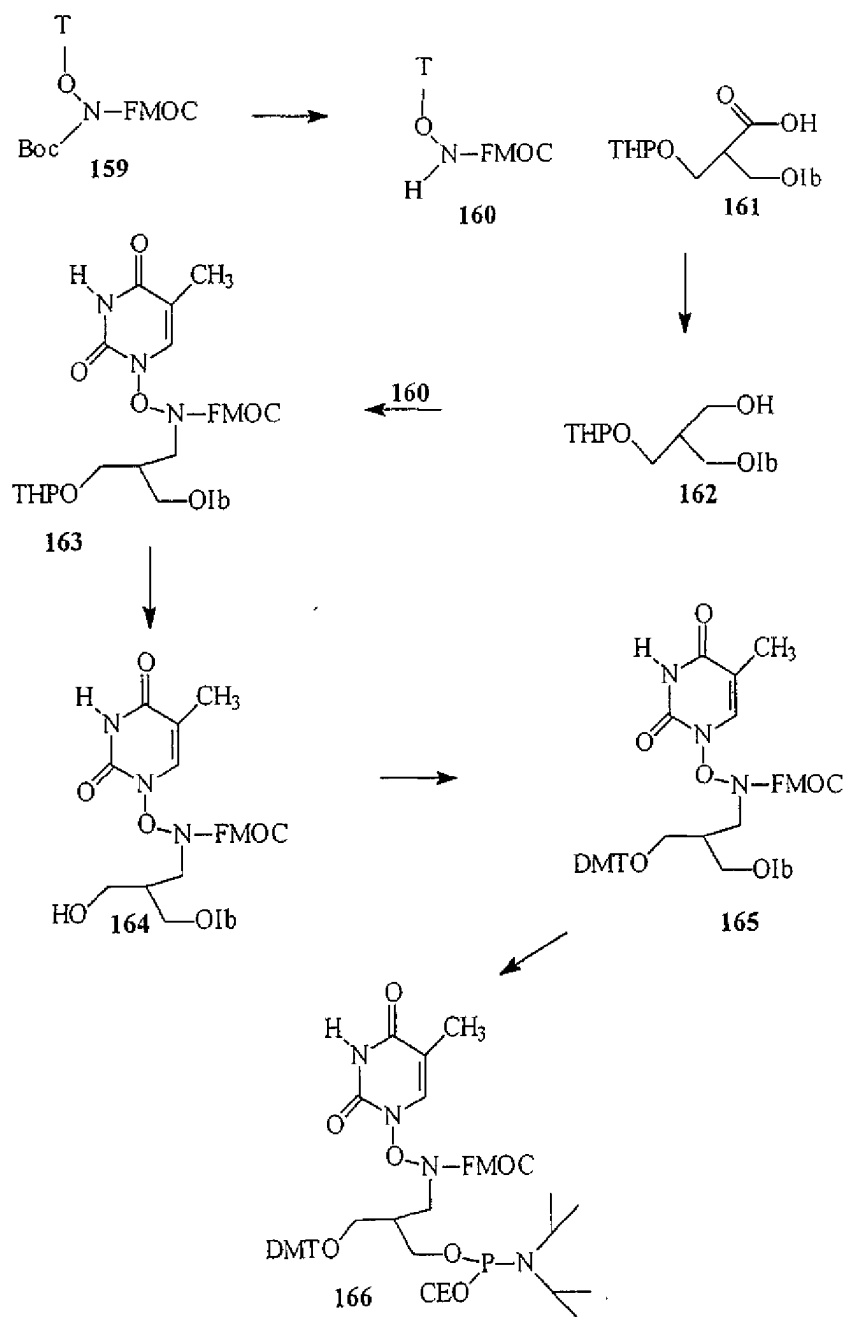
Фиг. 16



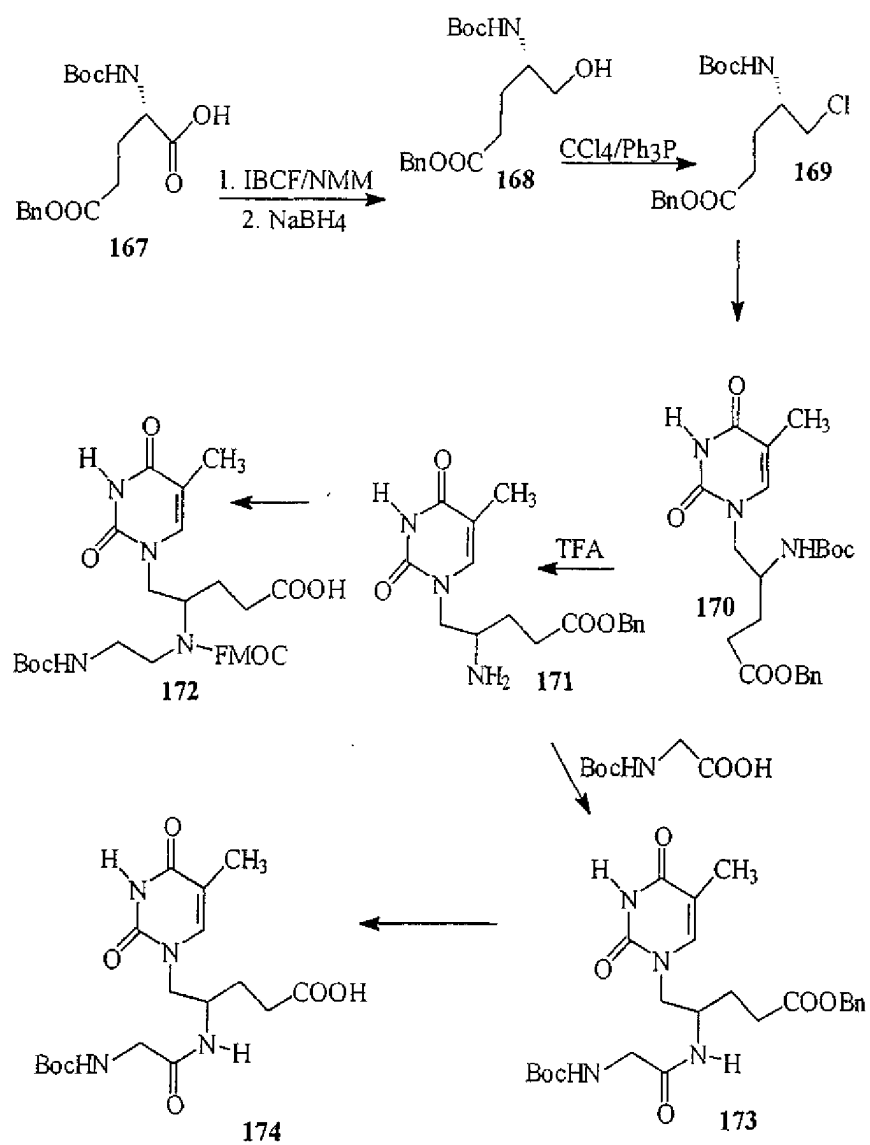
Фиг. 17



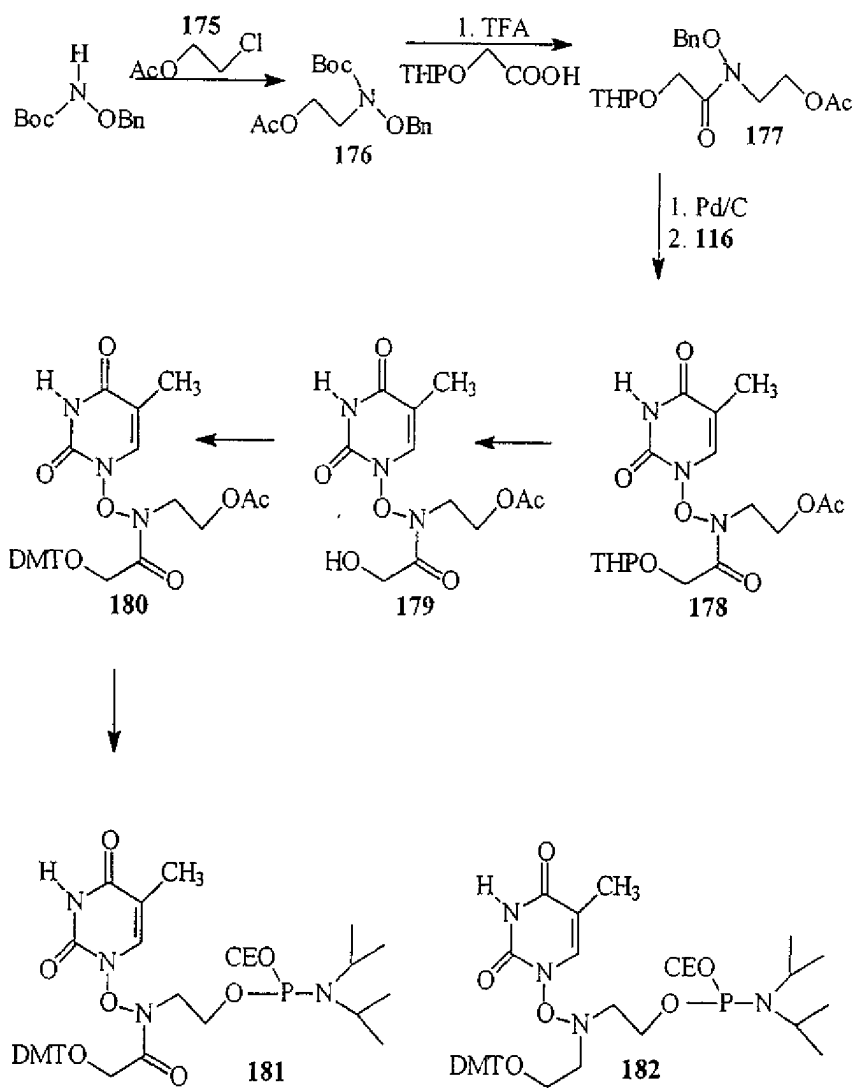
Фиг. 18



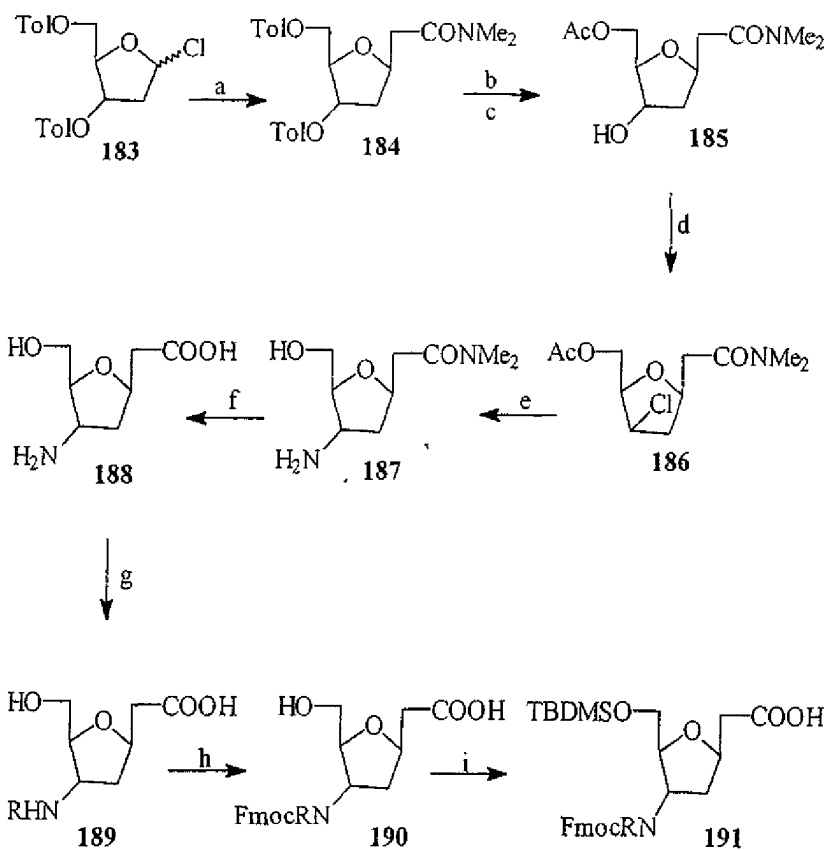
Фиг. 19



Фиг. 20

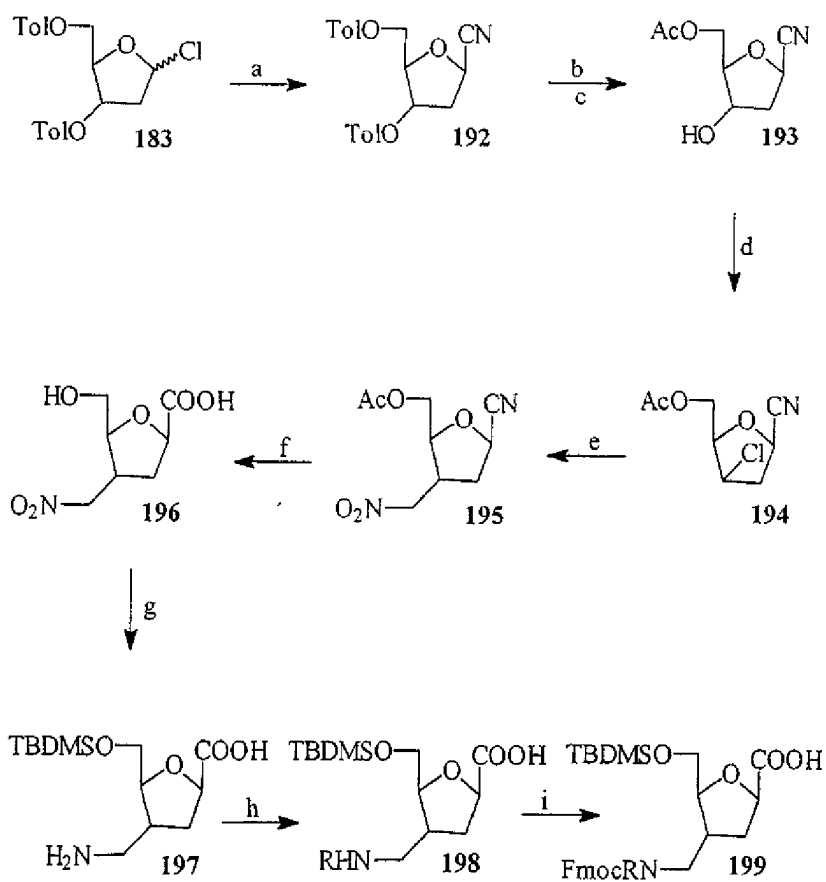


Фиг. 21



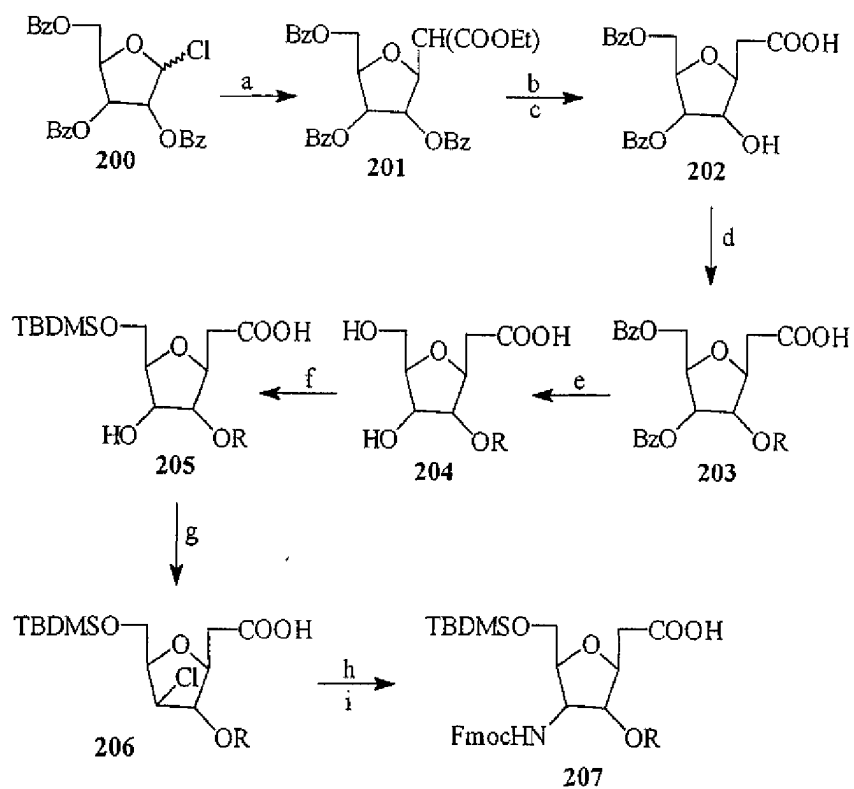
a) $\text{ICH}_2\text{CONMe}_2$ и Zn , b) $\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3$, c) Ac_2O , d) Ph_3P , CCl_4 , e) NH_3 ,
 f) $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$, g) BrCH_2B , где B - защищенное основание,
 h) Fmoc-Cl , i) TBDMSi-Cl .

Фиг. 22



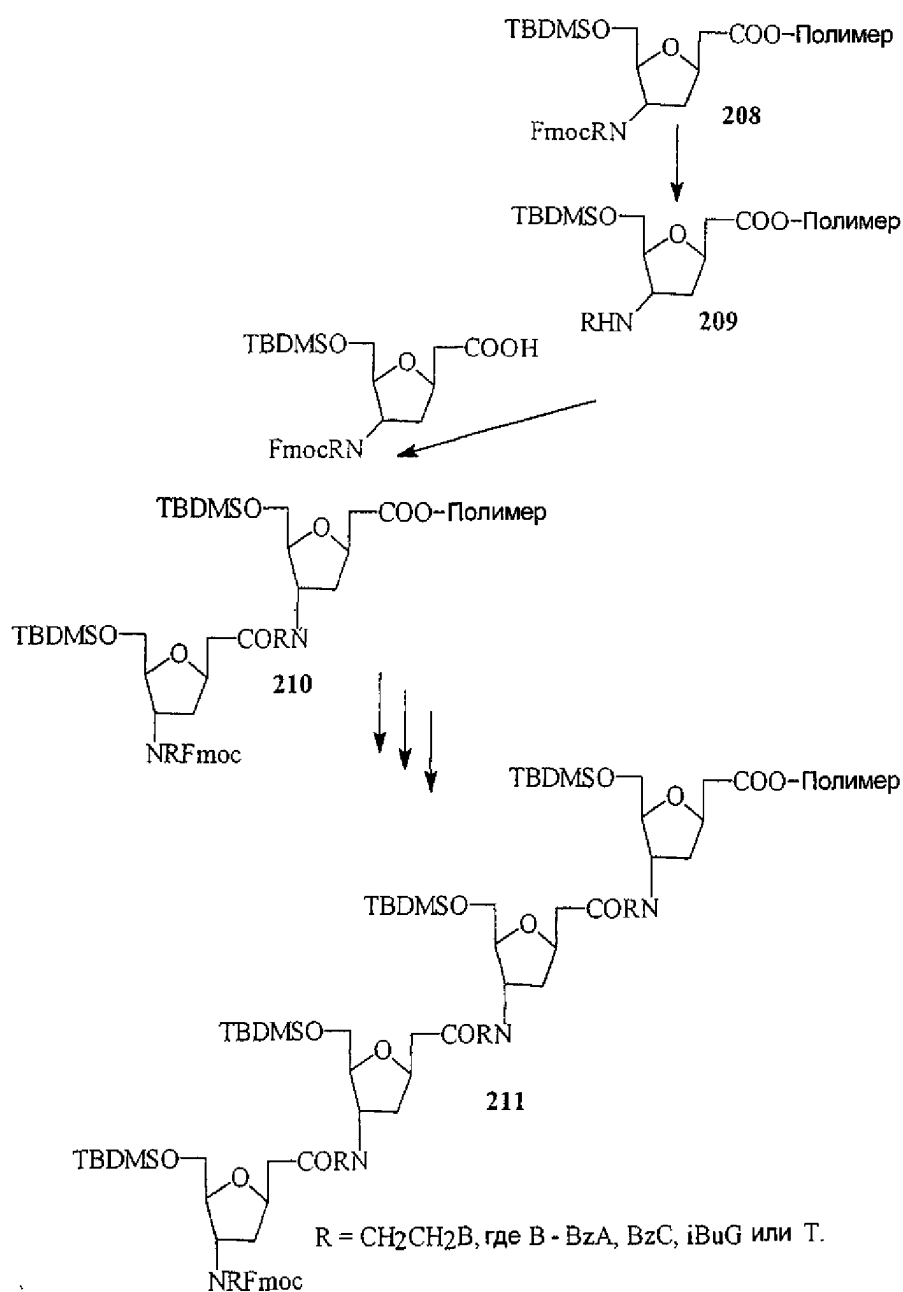
a) NaCN , b) NH_4OH , c) Ac_2O , d) Ph_3P , CCl_4 , e) CH_3NO_2 , f) $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$,
g) TBDMSi-Cl и Pd/C , h) BrCH_2B , где B - защищенное основание,
i) Fmoc-Cl .

Фиг. 23

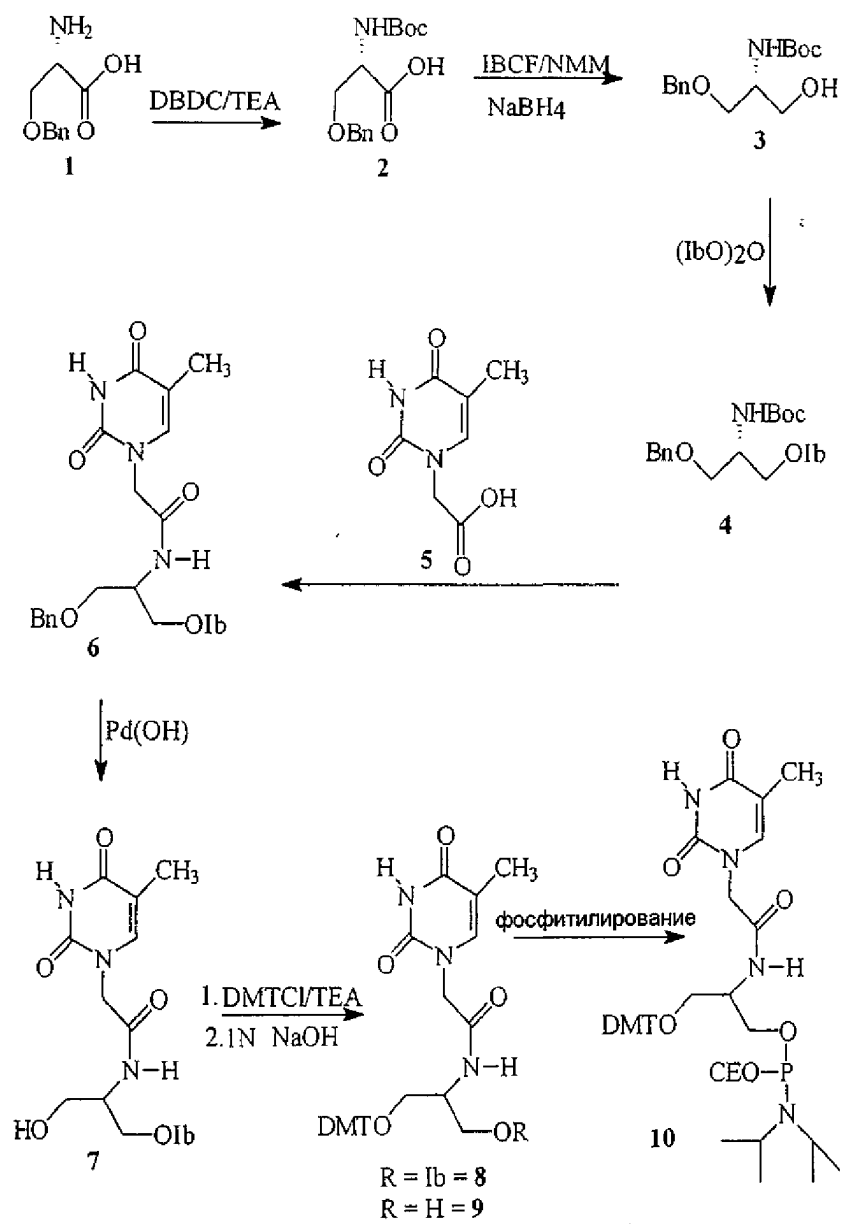


a) $\text{CH}_2(\text{COOEt})_2$, b) $\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3$, c) Нагревание,
d) $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{B}$, где B - защищенное основание,
e) NH_4OH , f) TBDMSi-Cl , g) $\text{Ph}_3\text{P}/\text{CCl}_4$, h) NH_3 , i) Fmoc-Cl .

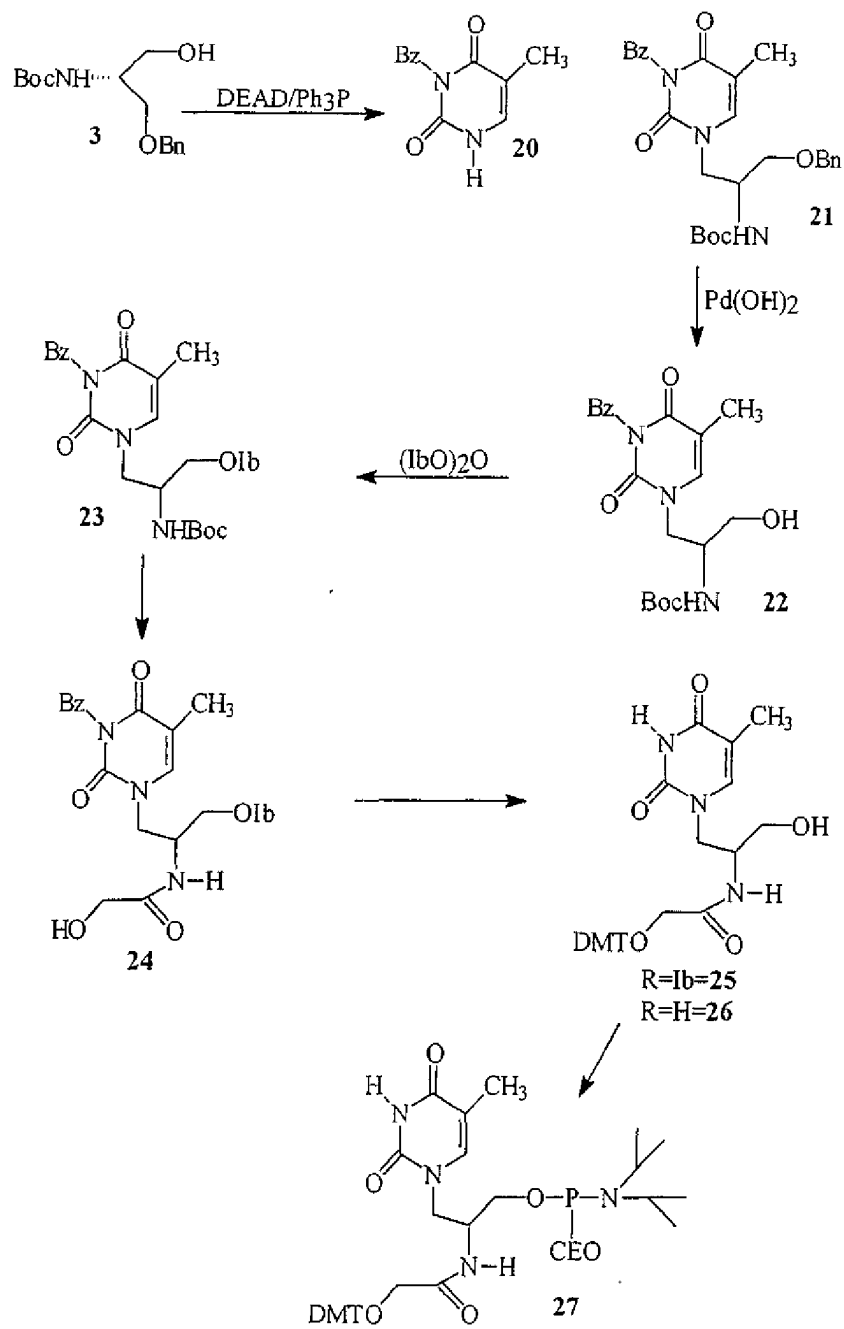
Фиг. 24



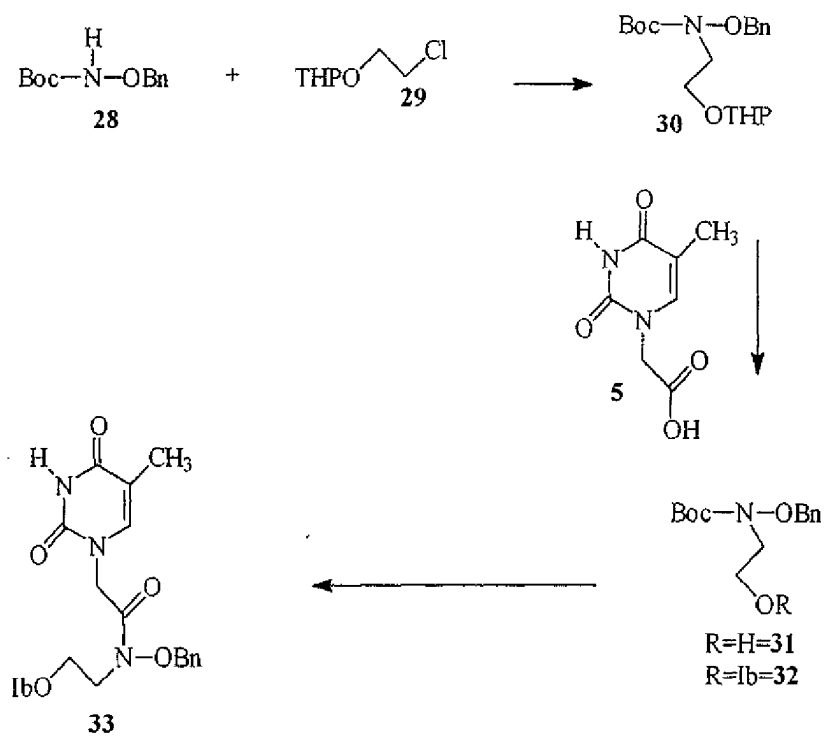
Фиг. 25



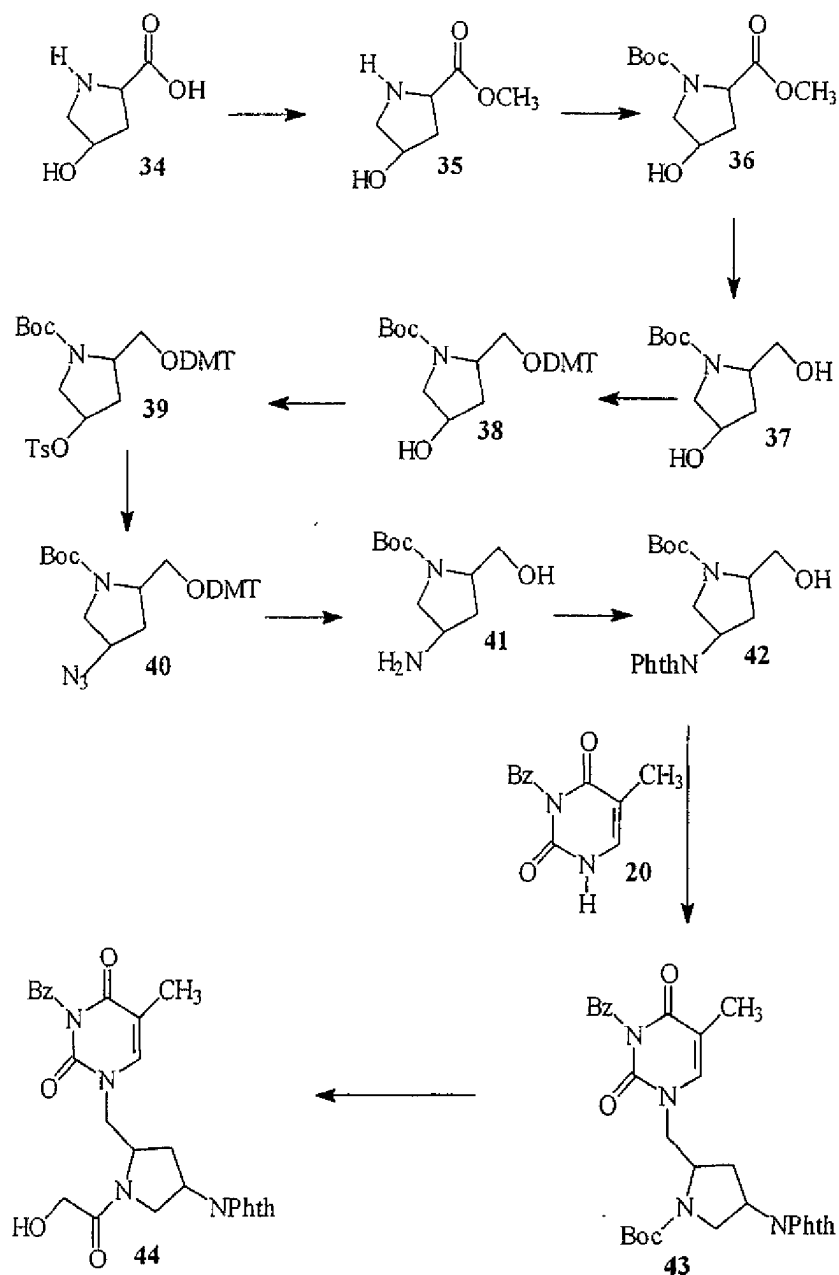
Фиг. 26



Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 8, 15.08.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.