



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 97041994, 02.11.1995

(24) Дата начала действия патента: 15.04.2002

(30) Приоритет: 02.11.1994 US 08/333545

(46) Дата публикации: 15.04.2002

(86) Заявка РСТ:
РСТ/US95/14600, 19951102

(19) **UA** (11) **45 362** (13) **C2**

(51)МПК ⁷ **A 61K 31/70 A, C 07H 19/06 B,
C 07H 19/10 B, C 07H 19/16 B, C
07H 19/20 B, C 07H 19/24 B, C
07H 21/02 B, C 07H 21/04 B**

(72) Изобретатель:

Ванг Гуанжи, US,
Рамасами Кандасами, US,
Зайферт Уилфрид, US

(73) Патентовладелец:

Ай-Си-Эн ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, US

(54) НУКЛЕОЗИДЫ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ САХАРАМИ И ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

(57) Реферат:

Описан ряд модифицированных нуклеозидов, содержащих модифицированные сахарные группы, которые содержат заместители в позициях С1 и С4 или разветвленные заместители в позициях С3 и С5 дезоксирибозы и рибозы. Каждый нуклеозид преобразуют, или в начале надлежащим образом защищают, а затем преобразуют, в соответствующий фосфорамидит. Эти фосфорамидиты используют для сборки олигонуклеотидов, содержащих хотя бы один упомянутый выше нуклеозид. Эти олигонуклеотиды с модифицированными сахарами

можно использовать как средства антисмысловой терапии, так как они должны быть более устойчивыми по отношению к нуклеазам и лучше проникать в клетку, сохраняя специфичность и аффинность связывания с последовательностями нуклеиновых кислот-мишеней.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 4, 15.04.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(19) **UA** (11) **45 362** (13) **C2**

(51) Int. Cl.⁷ **A 61K 31/70 A, C 07H 19/06
B, C 07H 19/10 B, C 07H 19/16 B,
C 07H 19/20 B, C 07H 19/24 B, C
07H 21/02 B, C 07H 21/04 B**

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

(21), (22) Application: 97041994, 02.11.1995

(24) Effective date for property rights: 15.04.2002

(30) Priority: 02.11.1994 US 08/333545

(46) Publication date: 15.04.2002

(86) PCT application:
PCT/US95/14600, 19951102

(72) Inventor:

Vang Guanji, US,
Ramasami Kandasami, US,
Zeifert Wilfried, US

(73) Proprietor:

ICN PHARMACEUTICALS, US

(54) **NUCLEOSIDES WITH MODIFIED SUGAR MOIETIES AND OLIGONUCLEOTIDES**

(57) Abstract:

A number of modified nucleosides are disclosed composed of modified sugar moieties which contain substituents at C1 and C4 positions, or branched substituents at C3 and C5 positions of deoxyribose or ribose. Each nucleoside is converted to or properly protected and then converted to the corresponding phosphoramidites. These phosphoramidites are used to assemble oligonucleotides in which there is at least one of the forenoted nucleosides. These sugar modified oligonucleotides have the

potential to be used as antisense therapies since they are expected to enhance nuclease resistance and cellular uptake while they maintain sequence-specificity and affinity to nucleic acid targets in vitro or in vivo.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 4, 15.04.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **45 362** ⁽¹³⁾ **C2**

(51)МПК ⁷ **A 61K 31/70 A, C 07H 19/06 B,
C 07H 19/10 B, C 07H 19/16 B, C
07H 19/20 B, C 07H 19/24 B, C
07H 21/02 B, C 07H 21/04 B**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
97041994, 02.11.1995

(24) Дата набуття чинності: 15.04.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 02.11.1994 US 08/333545

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.04.2002

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
PCT/US95/14600, 19951102

(72) Винахідник(и):

Ванг Гуанжі , US,
Рамасамі Кандасамі , US,
Зайферт Уілфрід , US

(73) Власник(и):

Ай-Сі-Ен ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, US

(54) НУКЛЕОЗИДИ З МОДИФІКОВАНИМИ ЦУКРАМИ ТА ОЛІГОНУКЛЕОТИДИ

(57) Реферат:

Описано ряд модифікованих нуклеозидів, які містять модифіковані вуглеводні групи. Модифікація полягає в наявності замісників в положеннях C1 та C4 або розгалужених замісників в положеннях C3 та C5 дезоксирибози або рибози. Кожний нуклеозид перетворюють у відповідний фосфорамідит безпосередньо або після необхідного захисту. Одержані фосфорамідити використовують для синтезу олігонуклеотидів, які

містять хоча б один згаданий вище нуклеозид. Ці олігонуклеотиди з модифікованими вуглеводними залишками можуть використовуватись як засоби антизмислової терапії, оскільки очікується, що вони є більш стійкими до нуклеаз і краще проникають до клітини, зберігаючи при цьому специфічність і афінність зв'язування з відповідними послідовностями нуклеїнових кислот, що є мішенями їхньої дії in vitro або in vivo.

Настоящее изобретение относится к аналогам полинуклеотидов, содержащим модифицированные сахара.

Использование олигонуклеотидов в качестве терапевтических средств - очень важная область деятельности, описанная, например, в [1] Zamecnik, P.C. and Stephenson, M.L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1978, 75, 280, 285; [2] Uhlmann, E. and Peyman, A. Chemical Reviews, 1990, 90, 543 - 584; [3] Goodchild, J. Bioconjugate chemistry, 1990, 1, 165 - 187, и [4] Crooke, S.T. and Lebleu, B. "Antisense Research and Applications", CRC Press (1993). Специфическое связывание антисмысловых полинуклеотидов с заданными РНК или ДНК может привести к инактивации функций, связанных с ДНК и РНК, таких как репликация, транскрипция или трансляция, тем самым обеспечивая механизм лечения таких заболеваний, как рак или вирусная инфекция. Поэтому связывание антисмыслового олигонуклеотида с мишенью может быть использовано для изменения экспрессии генов в различных условиях, например, для нарушения жизненного цикла вирусов или роста раковых клеток (Stein, C.A., Cheng, Y.C. Science, 1993, 261, 1004 - 1012). Кроме этого, некоторые нуклеотиды прочно связываются также с белковыми мишенями, т.е. действуют как ингибиторы ферментов. Bock и др. описывают олигонуклеотиды, *in vitro* ингибирующие образование фибриновых сгустков, катализатором которого служит человеческий тромбин (Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J. A., Vermaas, E.H., Toole, J.J. Nature, 1992, 355, 564 - 566). Ecker и др. описывают ряд олигонуклеотидов, в концентрациях до 1,0 мкмоль ингибирующих человеческий вирус простого герпеса. Полинуклеотиды, способные ингибировать ферменты, можно легко получить при помощи комбинаторного метода (Ecker, D.J., Vickers, T.A., Hanecak, R., Driver, V., Anderson, K. Nucleic Acids Res. 1993, 21, 1853 - 1856).

Сообщалось, что олигонуклеотид, содержащий разветвленный 5'-С-метил нуклеозид, обладает повышенной устойчивостью по отношению к нуклеазам (Saha, A.K. et al., стэнд на 206-й конференции Американского химического общества, Чикаго, 1993). Сообщали также, что олигонуклеотиды, содержащие 2'-О-метил-нуклеозиды, более устойчивы к воздействию нуклеаз и обладают повышенной аффинностью связывания с РНК (a. Inoue, H., Hayase, Y., Imura, A., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E., Nucleic Acids Res. 1987, 15, 6131; b. Shibahara, S., Mukai, S., Morisawa, H., Nakashima, H., Kobayashi, S., Yamamoto, N. Nucleic Acids Res. 1989, 17, 239). Отмечалось, что олигонуклеотид, содержащий 1-замещенный нуклеозид, обладает некоторой устойчивостью по отношению к нуклеазам (Ono, A., Dan, A., Matsuda, A. Bioconjugate Chemistry, 1993, 4, 499 - 508).

Антисмысловые олигонуклеотиды должны не только обладать специфической аффинностью связывания с заданными комплементарными последовательностями в полинуклеотидах, но и соответствовать требованиям терапевтического применения: обладать мощным действием, быть биологически доступными, малотоксичными и дешевыми. Поскольку олигонуклеотиды с природными фосфодиэфирными скелетами неустойчивы по отношению к нуклеазам и с трудом проникают сквозь клеточные мембраны, исследователи пытались выполнить модификации в скелетах полинуклеотидов, которые увеличили бы устойчивость по отношению к нуклеазам и облегчили бы проникновение в клетку. Главный недостаток аналогов олигонуклеотидов, используемых для антисмыслового управления, заключается в том, что модифицированные межнуклеотидные связи препятствуют активации антисмысловыми олигонуклеотидами рибонуклеазы Н, что приводит к деградации нити РНК, с которой связывается аналог олигонуклеотида. Поэтому нужно создать аналоги полинуклеотидов с более высокой устойчивостью по отношению к нуклеазам и более сильной способностью проникать в клетку, при этом не лишая их способности активировать рибонуклеазу Н.

Настоящим изобретением предложены новые разнообразные нуклеозиды с модифицированными сахарами и соответствующие олигонуклеотиды с модифицированными сахарами, превосходящие по свойствам природные РНК и ДНК при использовании для антисмыслового управления, диагностики и др.

В число соединений, предложенных настоящим изобретением, входят различные нуклеозиды с замещениями в позициях С1', С3', С4' или С5' сахарной группы.

Другой аспект настоящего изобретения - олигонуклеотиды, содержащие один или несколько нуклеозидов с модифицированными сахарами, предложенных настоящим изобретением.

Еще один аспект настоящего изобретения - конъюгаты к олигонуклеотидам, содержащим один или несколько нуклеозидов с модифицированными сахарами, предложенных настоящим изобретением.

На фиг. 1 представлены варианты олигонуклеотидов, соответствующих настоящему изобретению, в которых компоненты нуклеозидов замещены положительно заряженной группой.

На фиг. 2 приведена схема 1 реакции синтеза 3'-С-разветвленного тимидина.

На фиг. 3 приведена схема 2 реакции синтеза 3'-С-разветвленного тимидина.

На фиг. 4 приведена схема 3 реакции синтеза 4'-С-разветвленного тимидина.

На фиг. 5 приведены дополнения к схеме 3 реакции синтеза 4'-С-разветвленного тимидина.

На фиг. 6 приведена схема 4 реакции синтеза 4'-С-разветвленного тимидина.

На фиг. 7 приведена схема 5 реакции синтеза 5'-С-разветвленного тимидина.

На фиг. 8 приведена схема 6 реакции синтеза 5'-С-разветвленного тимидина.

На фиг. 9 приведены дополнения к схеме 6 реакции синтеза 5'-С-разветвленного тимидина.

На фиг. 10 приведена схема 7 реакции синтеза 5'-С-разветвленного тимидина.

На фиг. 11 приведена схема 8 реакции синтеза 5'-С-разветвленного тимидина.

Фиг. 12 - это схема, иллюстрирующая стереохимические свойства соединения 44 и других.

На фиг. 13 приведена схема 9 реакции синтеза 1'-С-разветвленного тимидина.

На фиг. 14 приведена схема 10реакции синтеза 1'-С-разветвленного тимидина.

Сокращения и определения

DMTr = 4,4'-диметокситритил

CEPA = 2-цианэтил-(N,N'-диизопропил)-фосфорамид

TBDMS = трет-бутилдиметилсилил

Ac = ацетил

TBDMSM = трет-бутилдиметилсилоксиметил

N₃ = азидо

CF₃CO = трифторацетил

T_f = трифторметансульфонил

THP = тетрагидропиранил

Ots = тосил

Термин "нуклеозид" в настоящем документе обозначает соединение, содержащее пуриновое или пиримидиновое основание (или его производное), ковалентно связанное с циклическим сахаром из 5 атомов углерода (фуранозой), например, рибозой, 2'-дезоксирибозой и 2',3'-дидезоксирибозой. Термин "нуклеозид" используется в широком смысле и относится также к нуклеозидам с модифицированными сахарами, предложенным настоящим изобретением.

Термин "полинуклеотид" в настоящем документе обозначает полимеры, состоящие из двух и более нуклеозидных единиц, каждая из которых связана с одной (конечной) или двумя (внутренними) другими нуклеозидными единицами при помощи межнуклеозидных связей, таких как фосфодиэфирные связи, пептидные связи, фосфонатные связи, фосфоротиоатные связи и т.п. Примерами полинуклеотидов служат РНК и ДНК. Термин "полинуклеотид" в настоящем документе используется (если не указано иное) в широком смысле и относится к полинуклеотидам с модифицированными сахарами, предложенным настоящим изобретением.

Термин "олигонуклеотид" в настоящем документе обозначает сравнительно небольшие полинуклеотиды, т.е. полинуклеотиды, содержащие от 2 до около 50 пар оснований; однако, олигонуклеотид может быть значительно длиннее.

Термин "гидроксил-блокирующая группа", используемый в настоящем документе, будет понятен среднему специалисту в области органической химии. Примеры гидроксил-блокирующих групп и других блокирующих групп можно найти (кроме всего прочего) в Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis" John Wiley & Sons, NY, NY (1991).

Термин "основание" и "нуклеозидное основание" в настоящем документе обозначают гетероциклические нуклеотидные основания, содержащиеся в природных нуклеиновых кислотах, такие как аденин, цитозин, гипоксантин, урацил, тимин, гуанин, и их аналоги, в том числе основания, не встречающиеся в природе, которые способны спариваться с природными основаниями. К таким не встречающимся в природе гетероциклическим основаниям относятся следующие, но не исключительно следующие: аза- и деаза-аналоги пиримидина, аза- и деаза-аналоги пурина, а также другие гетероциклические аналоги оснований, в которых один или несколько атомов углерода и азота пуриновых и пиримидиновых колец замещены гетероатомами, например, атомами кислорода, серы, селена, фосфора и т.п.

Настоящим изобретением предложены новые нуклеозиды и олигонуклеотиды, обладающие свойствами, желательными для использования их в ходе антисмыслового управления, диагностики и в других процессах, где применяются олигонуклеотиды. В число соединений, предложенных настоящим изобретением, входят различные нуклеозиды с модификациями-замещениями в позициях C1', C3', C4' и C5' сахарной группы нуклеозида. Нуклеозиды, предложенные настоящим изобретением, могут содержать одно или несколько замещений, облегчающих у частие нуклеозида в твердофазном синтезе, например, упомянутый нуклеозид может образовать фосфорамидитное производное с 5'-диметокситритилом или другими протекторными группами. Настоящее изобретение также обеспечивает создание олигонуклеотидов, содержащих один или несколько нуклеозидов с модифицированными сахарами, соединенных в виде нити нуклеиновой кислоты.

Помещение подходящего заместителя в позицию C3' или C5' нуклеозида изменяет среду, окружающую фосфодиэфирный скелет олигонуклеотида, содержащего эти нуклеозиды с модифицированными сахарами. В предпочтительных случаях в позициях C3' или C5' используются громоздкие заместители, чтобы предотвратить нежелательное взаимодействие с ферментами или их активными участками. Эти заместители в позициях C3' или C5' делают фосфодиэфирный скелет олигонуклеотидов недоступным для многих ферментов. За счет присутствия этих заместителей олигонуклеотиды, содержащие эти C3'- или C5'-разветвленные нуклеозиды, могут быть более устойчивыми по отношению к нуклеазам, чем ДНК или РНК. Заместители в позициях C1' и C4' нуклеозидов могут давать те же благоприятные эффекты, что и заместители в позициях C3' и C5'.

В тех вариантах осуществления изобретения, в которых олигонуклеотиды содержат сахара, модифицированные положительно заряженными аминоалкилами, суммарный отрицательный заряд олигонуклеотидов в физиологических условиях уменьшается, так что двойная спираль, образованная хотя бы одной нитью этих олигонуклеотидов, может оказаться более устойчивой, чем соответствующий немодифицированный олигонуклеотид (см. Фиг. 1). Таким образом, в вариантах осуществления изобретения, в которых олигонуклеотиды содержат сахара, модифицированные аминоалкилами или подобными положительно заряженными заместителями, этот положительный заряд может способствовать повышению аффинности связывания олигонуклеотидов с полинуклеотидами-гибридизационными мишенями. Средний специалист в данной области поймет, что хотя изложенные выше теоретические соображения и служат отправной точкой для разработки и использования дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения, они не

должны обязательно оправдываться при его осуществлении.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения - это нуклеозиды с модифицированными сахарами, соответствующие формуле:



10 где R₁ - это алкил, аралкил, арил, замещенный алкил, замещенный аралкил или замещенный арил, а заместители NO₂, CN, N₃, COOEt, OH, SH, CONH₂, CONHR, CONR₂, COOH, OAc, NH₂, NHAc, NMe₂, CF₃CONH, OR, SR, SO₂CH₃, CF₃, F, Cl, BR, I, OTs, ⁺NMe₃, CH=CHR, C=CR, где R - это алкил; R₂ - это H, OH, алкоксил или арилоксил; R₃ - OH или O-CEPA; R₄ - OH или гидроксил-блокирующая группа; B - это гетероциклическое нуклеозидное основание; X - это O, S, NH или CH₂.

15 Гетероциклическое нуклеозидное основание B нуклеозидов с модифицированными сахарами, предложенных настоящим изобретением, представленное в формулах 45, 46, 47, 48, 49, 50, может быть любым гетероциклическим нуклеозидным основанием, природным или синтетическим. Так, гетероциклические нуклеозидные основания, которые могут служить основаниями в нуклеозидах с модифицированными сахарами, предложенных настоящим изобретением, могут относиться к пуринам (например, аденин, гуанин или ксантин),
20 пиримидинам (например, тимин, урацил, цитозин) и их гетероциклическим аналогам и таутомерам. Подходящими гетероциклическими основаниями, которые могут служить основаниями в нуклеозидных соединениях, предложенных настоящим изобретением, являются те, которые можно включить в одну из нитей двухнитевого полинуклеотида с возможностью спаривания с природным основанием в комплементарной нити полинуклеотида. Кроме того, основания нуклеозидных соединений, предложенных настоящим изобретением,
25 соединяются с сахарными группами такими своими частями, что соединение не препятствует спариванию основания, упомянутому выше.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения - это нуклеотиды, соответствующие формуле:



35 где R₁ - это алкил, аралкил, арил, замещенный алкил, замещенный аралкил или замещенный арил, а заместители NO₂, CN, N₃, COOEt, OH, SH, CONH₂, CONHR, CONR₂, COOH, OAc, NH₂, NHAc, NMe₂, CF₃CONH, OR, SR, SO₂Me, CF₃, F, Cl, BR, I, OTs, ⁺NMe₃, CH=CHR, C=CR, где R - это алкил; R₂ - это H, OH, алкоксил или арилоксил; R₃ - OH, O-TBDMS, O-CEPA; R₄ - OH, CHO или гидроксил-блокирующая группа; B - это гетероциклическое нуклеозидное основание; X - это O, S, NH или CH₂, а углерод, присоединенный к R₁ и R₄,
40 имеет конфигурацию R или S.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения - это нуклеозиды, соответствующие формуле:



где R₁ - это алкил, аралкил, арил, замещенный алкил, замещенный аралкил или замещенный арил, а заместители NO₂, CN, N₃, COOEt, OH, SH, CONH₂, CONHR, CONR₂, COOH, OAc, NH₂, NHAc, NMe₂, CF₃CONH, OR, SR, SO₂Me, CF₃, F, Cl, BR, I, OTs, ⁺NMe₃, CH=CHR, C=CR, где R - это алкил; R₂ - это H, OH, алкоксил или арилоксил; R₃ - OH, OTBDMS, O-CEPA; R₄ - это OH или гидроксил-блокирующая группа; B - это
50 гетероциклическое нуклеозидное основание; X - это O, S, NH или CH₂.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения - это нуклеотиды, соответствующие формуле:



где R₁ - это алкил, аралкил, арил, замещенный алкил, замещенный аралкил, замещенный арил, а заместители NO₂, CN, N₃, COOEt, OH, SH, CONH₂, CONHR, CONR₂, COOH, OAc, NH₂, NHAc, NMe₂, CF₃CONH, OR, SR, SO₂Me, CF₃, F, Cl, BR, I, OTs, ⁺NMe₃, CH=CHR, C=CR, где R - это алкил; R₂ - это H, OH, алкоксил или арилоксил; R₃ - OH, O-MBn, O-CEPA; R₄ - это OH или гидроксил-блокирующая группа; B - это гетероциклическое нуклеозидное основание; X - это O, S, NH или CH₂.

Другой аспект настоящего изобретения предусматривает различные эпоксидные производные от нуклеозидов с модифицированными сахарами, предложенных настоящим изобретением, производные,
65 соответствующие формулам:



где R выбирают из группы, состоящей из CH₂OH, CH₂, ODMTr, CHO, COOH, COOEt, а X выбирают из группы, состоящей из O и CH₂. Эпоксиды могут иметь любую из возможных стереохимических конфигураций.

Нуклеозиды с модифицированными сахарами, предложенные настоящим изобретением, можно синтезировать в соответствии с примерами, приведенными в соответствующем разделе этой заявки. Средний специалист в области органической химии может, руководствуясь этими примерами, синтезировать различные соединения, соответствующие настоящему изобретению, процедуры синтеза которых не описаны.

Олигонуклеотиды, содержащие нуклеозиды с модифицированными сахарами

Полинуклеотиды, соответствующие настоящему изобретению, содержат один или несколько нуклеозидов с модифицированными сахарами, соответствующих настоящему изобретению, причем нуклеозид с модифицированным сахаром, соответствующий настоящему изобретению, соединен либо со вторым нуклеозидом с модифицированным сахаром, либо с немодифицированным нуклеозидом, и соединены нуклеозиды межнуклеозидными связями. К нуклеозидам с модифицированными сахарами, пригодным для

включения в олигонуклеотиды, относятся соединения, описанные формулами 45, 46, 47 и 48. Полинуклеотиды-аналоги, предложенные настоящим изобретением, не ограничены в смысле числа нуклеозидов-субъединиц в отдельном полинуклеотиде-аналоге; однако, как правило, удобнее синтезировать короткие полинуклеотиды-аналоги, например, полинуклеотиды-аналоги, содержащие не более 50 оснований.

Отдельные нуклеозиды, предложенные настоящим изобретением, можно соединить при помощи межнуклеозидных связей таким образом, чтобы получить новые олигонуклеотиды с заданными последовательностями нуклеозидных оснований. Межнуклеозидные связи - это связи типа C3'-C5' или C2'-C5'. Термин "межнуклеозидные связи" в настоящем документе относится не только к фосфодиэфирному скелету, за счет которого образуются межнуклеозидные связи в ДНК (дезоксирибонуклеиновых кислотах) и РНК (рибонуклеиновых кислотах), но и к ряду других групп, выполняющих ту же структурную функцию, что и фосфодиэфирные связи в ДНК и РНК. Примерами других межнуклеозидных связей, приемлемых для включения в олигонуклеотиды, соответствующие настоящему изобретению, могут служить фосфоротиоаты, метилфосфонаты, фосфородитиоаты, борофосфонаты, селенофосфонаты, фосфорамидаты, ацетамидаты и т.п. Описание синтеза и применения различных межнуклеозидных связей можно найти, помимо других источников, в патенте США 5256775, международной публикации W093/24507, международной публикации W092/05186, патенте США 5264562, международной публикации W092/02534, международной публикации W094/06811, международной публикации W093/17717, патенте США 5212295, патенте США 5292875, патенте США 5218103, патенте США 5166387, патенте США 5151516, патенте США 4814448, патенте США 4814451, патенте США 4096210, патенте США 4094873, патенте США 4092312, патенте США 4016225, патенте США 4007197.

Полинуклеотиды, соответствующие настоящему изобретению, с заданной последовательностью оснований могут быть получены, при помощи методов синтеза полимеров нуклеиновых кислот, хорошо известных средним специалистам в области органической химии. В предпочтительном случае полинуклеотиды, соответствующие настоящему изобретению, синтезируют в соответствии с принципами фосфорамидитной химии для включения одного или нескольких новых нуклеозидов, предложенных настоящему изобретению, в полинуклеотид-аналог. Разветвленные заместители в позициях C3' или C5' нуклеозидов могут снизить скорость соединения. Этот эффект зависит от размера заместителей. Поэтому для нуклеозидов с громоздкими заместителями бывает необходимо увеличить время соединения даже в 10 раз. При необходимости для увеличения скорости реакции соединения можно проводить повторные реакции со свежими реагентами или использовать более высокие концентрации реагентов. По окончании синтеза олигонуклеотиды обрабатывают так же, как стандартные немодифицированные олигонуклеотиды, т.е. отщепляют от твердых подложек при помощи 30% аммиака, удаляют протекторные группы в течение 8 часов при 55°C и очищают посредством обращенно-фазной жидкостной хроматографии высокого разрешения (ЖХВР).

Для проверки чистоты олигонуклеотидов и присутствия в них требуемых нуклеозидов с модифицированными сахарами, очищенные олигонуклеотиды можно исследовать путем анализа продуктов их переваривания ферментами, например, такими как фосфодиэстераза из змеиного яда или бактериальная щелочная фосфатаза. Продукты деградации можно подвергнуть хроматографическому (ЖХВР) анализу или проанализировать другим способом и сравнить с образцами исходных нуклеозидов. Структуру очищенных олигонуклеотидов можно определить при помощи масс-спектропии, например, с электрораспылением.

Другой аспект настоящего изобретения предусматривает конъюгаты с олигонуклеотидами, содержащими модифицированные сахара. Чтобы создать площадку для конъюгации требуемой группы с олигонуклеотидом, в позициях C1', C3', C4' и C5' входящих в него нуклеозидов можно присоединить аминные, гидроксильные,

тиоловые и карбоксиалкиловые линкеры. Линкеры, присоединяемые в позициях С1' и С3', можно использовать для того, чтобы направлять конъюгированную группу в малую бороздку двухнитевой нуклеиновой кислоты, а линкеры, присоединяемые в позиции С4', - чтобы направлять конъюгированную группу в большую бороздку. Линкеры, присоединяемые в позиции С5', направляют конъюгированную группу либо в большую, либо в малую бороздку двухнитевой нуклеиновой кислоты: в зависимости от стереохимии самого линкера в позиции С5'. При помощи линкеров можно присоединять и размещать в нужных позициях разнообразные функциональные группы, такие как искусственная нуклеаза, перекрестно-связывающие агенты, интеркаляторы и репортерные молекулы.

Поскольку олигонуклеотиды, предложенные настоящим изобретением, обладают значительной связывающей активностью по отношению к одно- и двухнитевым нуклеиновым кислотам-мишеням и образуют устойчивые двойные, тройные и другие структуры с природными полинуклеотидами и их структурными аналогами, олигонуклеотиды, предложенные настоящим изобретением, могут быть использованы в большинстве процессов, в которых используются обычные олигонуклеотиды. Так, олигонуклеотиды, 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. Олигонуклеотиды, предложенные настоящим изобретением, также могут быть использованы для диагностики и лечения заболеваний. Терапевтическое применение олигонуклеотидов, 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 олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды, 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 олигонуклеотидов, могут служить гены/РНК, кодирующие ферменты, гормоны, сывороточные белки, трансмембранные белки, адгезионные молекулы (LFA-1, GPIIb/IIIa, ELAM-1, VACM-1, ICAM-1, E-selection 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.

Олигонуклеотиды, 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*, *k-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 олигонуклеотиды могут быть использованы в сочетании с другими терапевтическими средствами. К другим областям терапевтического применения олигонуклеотидов, предложенных настоящим изобретением, относятся (1) модуляция воспалительных реакций за счет модуляции экспрессии генов, таких как гены рецептора IL-1, IL-1, ICAM или E-Selection, 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, *тue*, *fox*, PCNA, PDGF или FGF или их рецепторов или (б) факторов пролиферации клеток, таких как *c-myc*. При лечении псориаза и других состояний мишенями могут служить другие факторы пролиферации или факторы передачи сигналов, такие как TGFa, 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, TGFa или рецептора EGF.

Олигонуклеотиды, предложенные настоящим изобретением, могут с успехом заменить обычные Олигонуклеотиды во многих нетерапевтических процессах, таких как гибридизация с целью обнаружения последовательностей нуклеиновой кислоты, полимеразная цепная реакция и т.п. Эти нетерапевтические процессы хорошо известны средним специалистам в области молекулярной биологии и описаны, например, у Sambrook et al. Molecular Cloning Techniques 2nd Edition Clod Spring Harbor (1989).

Эффективность доставки олигонуклеотидов, предложенных настоящим изобретением, в клетки можно повысить любым подходящим способом, в том числе путем трансфекции при помощи фосфата кальция, деметилсульфоксида, 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. Олигонуклеотиды 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 олигонуклеотидов, предложенных настоящим изобретением, можно также при помощи (i) вирусов, таких как вирус Сендай (Bartzzatt, R., *Biotechnol Appl Biochem.*, 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, N₁₂-бис (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 Biophys 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 Biophys ACTA*, 1992, 1103, 185 - 197; Cheddar, G. et al, *Arch Biochem Biophys*, 1992, 294, 188 - 192; Yoshimura, T., et al, *Biochem Int.*, 1990, 20, 697 - 706); (v) 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 олигонуклеотидов, о которых идет речь. В настоящем документе под трансфекцией подразумевается любой способ, приемлемый для доставки олигонуклеотидов 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 олигонуклеотидов 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) транслируемые РНК, кодирующие белок/белки или фрагменты белка.

Таким образом, олигонуклеотиды, 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 олигонуклеотиды, могут быть использованы такие соединения как полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, азон, ноноксил-9, олеиновая кислота, диметилсульфоксид, полиамины или липополиамины.

Синтез 3'-С-разветвленных нуклеозидов

Замещение гидроксильной группы в позиции С3' нуклеозидов другими функциональными группами с сохранением водорода в позиции С3' описано, помимо других источников, у De Clercq, E., *Antiviral Res.* 1989, 12, 1 - 20. Замещение водорода в позиции С3' нуклеозидов другими функциональными группами описано у Fedorov, I.I., Kazmina, E.M., Novicov, N.A., Gurskaya, G.V., Bochkarev, A.V., Jasko, M.V., Victorova, L.S., Kuhkanova, M.K., Balzarini, J., De Clercq, E. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 4567 - 4575. Настоящим изобретением предусмотрены процедуры приготовления большого числа разнообразных 3'-С-разветвленных нуклеозидов. Примеры методик приготовления 3'-С-разветвленных тимидинов приведены на схемах реакций 1 и 2 (Фиг. 2 и 3, соответственно). Эти процедуры можно легко адаптировать для синтеза других нуклеозидов, соответствующих настоящему изобретению, в том числе соответствующих тем вариантам осуществления изобретения, в которых нуклеозиды содержат основания, отличные от тимина. Соединение 4 было приготовлено из тимидина в три этапа, как описано у Jorgensen, P.N., Thrane, H., Wengel, J. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 2231. Обработка соединения 4 тосил хлоридом в пиридине дала тосилат, соединение 5. Реакция соединения 5 с цианидом калия в N,N-диметилформамиде дала 3'-С-цианметилтимидиновое производное, соединение 6. Реакция соединения 5 с азидом натрия в N,N-диметилформамиде дала 3'-С-азидометилтимидиновое производное, соединение 7. Подобным образом, реакции соединения 5 с различными нуклеофильными реагентами дают разнообразные 3'-С-разветвленные тимидиновые производные, в которых ориентация 3'-С-гидроксильной группы остается той же, что и в тимидине. Обработка соединения 6 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидитом и диизопропилэтиламино в дихлорметане дала фосфорамидит, соединение 8 - строительную единицу для синтеза олигонуклеотидов. Соединение 7 подвергли такой же обработке и получили соединение 9. Подобным образом можно преобразовать и другие 3'-С-разветвленные тимидиновые производные в соответствующие фосфорамидиты. Эта стандартная процедура описана у F. Eckstein, "Oligonucleotide Synthesis", Oxford University Press (1991). Обработка соединения 5 гидридом натрия в тетрагидрофуране дала эпоксидное производное, соединение 10. Реакция соединения 10 с алюмогидридом лития в тетрагидрофуране дала 3'-С-метилтимидиновое производное, соединение 11, которое было преобразовано в фосфорамидит, соединение 12. Реакция соединения 10 с аммиаком в метаноле дала 3'-С-аминометилтимидиновое производное, соединение 13, которое обработали этилтиотрифторацетатом в тетрагидрофуране и получили защищенное аминопроизводное, соединение 14. Соединение 14 преобразовали в фосфорамидит, соединение 15. Подобным же образом, реакции соединения 10 с разнообразными нуклеофильными реагентами дают различные 3'-С-разветвленные тимидиновые производные, в которых ориентация 3'-С-гидроксильной группы остается той же, что и в тимидине, так как нуклеофилы атакуют наименее закрытый углерод эпоксидного кольца. Так, реакции соединения 10 со спиртами в присутствии оснований дают алкоксиметилтимидины. Для приготовления 3'-С-(замещенный алкоксиметил)-тимидинов можно использовать спирты с замещениями. В неисчерпывающий перечень заместителей входят NO₂, CN, COOEt и защищенные аминогруппы. Реакции соединения 10 с двухатомными спиртами дают 3'-С-гидроксиалкоксиметилтимидины, которые можно легко преобразовать в 3'-С-галогеналкоксиметилтимидины. Реакция соединения 10 с нитрометаном дает 3'-С-нитроэтилтимидин. Восстановление 3'-С-нитроалкилтимидинов дает 3'-С-аминоалкилтимидины. Реакции

соединения 10с циан-замещенными кадмий-органическими соединениями дает 3'-С-цианалкилтимидины. Реакции соединения 10 с этоксикарбонилалкилцинковыми реагентами дают 3'-С-этоксикарбонилалкилтимиды, которые легко гидролизуются в 3'-С-карбоксиалкилтимидины в щелочной среде.

Для некоторых реакций, в которых участвуют литиевые медь-органические реагенты, бывает необходимо защитить амидную группу тимидина. В качестве протекторной группы предпочтительным является трет-бутилдиметилсилоксиметил (TBDMSM), так как его можно легко удалить при помощи тетрабутиламмония фторида (TBAF) по окончании необходимых преобразований. Группу N-TBDMSM можно ввести при помощи реакции 3,5-диацилированного тимидина с трет-бутилдиметилсилоксиметил хлоридом в пиридине. N-TBDMSM тимидин подвергают обработке, описанной для тимидина, и получают тосилат, производное соединения 5, и эпоксид, производное соединения 10, соответственно, которые можно использовать для приготовления 3'-С-алкилтимидинов и 3'-С-алкенилтимидинов при помощи реакций с литиевыми реагентами. Гидроборирование или окислительное расщепление полученных 3'-С-(ω-алкенил)-тимидинов дает гидроксиалкилтимидины, где гидроксил можно преобразовать в различные функциональные группы, такие как NH₂, OR, SR, SH и X, где R - это H или алкил, а X - это F, Cl, Br, I, Ots.

Синтез 4'-С-разветвленных нуклеозидов

Имеются сообщения о 4'-С-разветвленных нуклеозидах O-Yang C., Wu, H. Y., Fraser-Smith, E.B., Walker, K.A.M. Tetrahedron Lett.s, 1992, 33, 37 - 40. Настоящим изобретением предусмотрены процедуры приготовления многих новых 4'-С-разветвленных нуклеозидов. Приготовление 4'-С-разветвленных тимидинов показано на схемах реакций 3, 4 и 5 (Фиг. 4, 5, 6 и 7, соответственно). Эти процедуры можно легко адаптировать для синтеза других нуклеозидов, соответствующих настоящему изобретению, в том числе соответствующих тем вариантам осуществления изобретения, в которых нуклеозиды содержат основания, отличные от тимина. Соединение 16, приготовленное из тимидина, обработали диметокситритилхлоридом и получили соединение 17. Группу трет-бутилдиметилсилил (TBDMS) соединения 17 удалили посредством обработки TBAF и получили соединение 18, которое окислили до альдегида, соединение 19, за счет обработки диметилсульфоксидом, DCC, трифторуксусной кислотой и пиридином. Соединение 19 преобразовали в соединение 20, 4'-С-гидроксиметилтимидиновое производное, при помощи процедуры, подобной описанной у а) O-Yang C., Wu, H.Y., Fraser-Smith, E.B., Walker, K.A.M. Tetrahedron letts, 1992, 33, 37 - 40; б) Jones, G. H., Taniguchi, M., Tegg, D., Moffatt, J.G. J. Org. Chem. 1979, 44, 1309 - 17). Диметокситритиловую группу соединения 20удалили при помощи 80% уксусной кислоты и получили соединение 21, 4'-С-гидроксиметилтимидин. Избирательное бензоилирование соединения 21 бензоильным ангидридом дает соединение 22, 3'- и 5'-гидроксильные группы которого защитили тетрагидропиранилом (THP) в ходе реакции соединения 22 с дигидропираном в присутствии толуолсульфокислоты в дихлорметане. Полученное соединение 23 обработали водным гидроксидом натрия и получили соединение 24, которое, реагируя с метил йодидом в присутствии гидроксида натрия при 0°С, дало 4'-С-метоксиметилтимидиновое производное, соединение 25. Удаление протекторных групп THP соединения 25 дало соединение 26, 4'-С-метоксиметилтимидин. В некоторых реакциях вместо протекторной группы THP желателно использовать группу TBDMS, так как присутствие группы THP приводит к образованию диастереомеров. Таким образом, обработка соединения 22 трет-бутилдиметилхлорсиланом дает 3',5'-О-(бис-TBDMS)-производное тимидина, соединение 27. Удаление бензоила при помощи этилендиамина при 50°С, дало соединение 28, которое, реагируя, с трифторметансульфоновым ангидридом и пиридином в дихлорметане, дает трифлат (triflate), соединение 29. Реакция соединения 29 с аммиаком в диоксане дала 4'-С-аминометилтимидиновое производное, соединение 30. Реакция соединения 29 с азидом натрия в N,N-диметилформамиде дала 4'-С-азидометилтимидиновое производное, соединение 31. Удаление протекторных групп TBDMS соединений 30 и 31 дало соединения 32 и 33, 4'-С-аминометилтимидин и 4'-С-азидометилтимидин, соответственно. Аминогруппу соединения 33 защитили трифторацетилем и получили соединение 34. Реакции соединений 32 и 34 с диметокситритилхлоридом в пиридине дали соединения 35 и 36, соответственно. Соединения 35 и 36 преобразовали в соответствующие фосфорамидиды, соединения 37 и 38, соответственно, посредством обработки 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидитом.

Реакции соединения 29 с реактивами Гриньяра (Grignard) дают 4'-С-алкилтимидины и 4'-С-алкенилтимидины. Гидроборирование или окислительное расщепление полученных 4'-С-(ω-алкенил)-тимидинов дает гидроксиалкилтимидины, гидроксил которых можно преобразовать в ряд функциональных групп, таких как NH₂, OR, SR, SH и X, где R - это H или алкил, а X - это F, Cl, Br, I, Ots. Реакции соединения 29 с этоксикарбонилалкилцинковыми реагентами дают 4'-С-этоксикарбонилалкилтимидины, которые можно гидролизовать в 4'-С-карбоксиалкилтимидины. Реакции соединения 29 с алкоксидами натрия дают 4'-С-алкоксиметилтимидины. Для приготовления 4'-С-(замещенный алкоксиметил)тимидинов можно использовать спирты и фенолы с замещениями. В числе заместителей могут быть NO₂, CN, COOEt, OAc или защищенные аминокгруппы. В готовых 4'-С-разветвленных тимидинах 5'-гидроксильные группы защищают диметокситритилом, а 3'-гидроксильные группы преобразуют в фосфорамидиды для синтеза олигонуклеотидов, который проводят в соответствии со стандартной процедурой (F. Eckstein, "Oligonucleotide synthesis" Oxford University Press (1991)).

Синтез 5'-С-разветвленных нуклеозидов

Настоящее изобретение предусматривает процедуры приготовления большого числа 5'-С-разветвленных нуклеозидов. Примеры методик приготовления 5'-С-разветвленных тимидинов представлены на схемах в, 1 и 8 (Фиг. 8, 9 и 10, соответственно). Эти процедуры можно легко адаптировать для синтеза других нуклеозидов, соответствующих настоящему изобретению, в том числе для осуществления тех вариантов изобретения, в

которых нуклеозиды содержат основания, отличные от тимина. Соединение 42 приготовили в три этапа в соответствии с известной процедурой (O-Yang C., Wu, H.Y., Fraser-Smith, E.B., Walker, K.A.M. Tetrahedron Letts, 1992, 33, 37 - 40). В соответствии с другой процедурой соединение 42 получили в результате реакции 80% уксусной кислоты с соединением 41, 3',5'-O-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-тимидином, приготовленным при помощи реакции тимидина с избытком трет-бутилдиметилхлорсилана и имидазола в пиридине. Реакция Виттига между соединением 42 и илтидом фосфора, приготовленным из метилтрифенилфосфония бромидом и гидрида натрия в диметилсульфоксиде (ДМСО), дала олефиновое производное, соединение 43. Эпоксидирование соединения 43 m-хлорпероксибензойной кислотой в дихлорметане дало 5'-(S)-эпоксидное производное, соединение 44 (основной продукт) и 5'-(R)-эпоксидное производное (примесь). Стереохимические свойства соединения 44 и других представлены на диаграмме 1 (Фиг. 12). Реакция соединения 44 с аммиаком в метаноле дала 5'-(S)-С-аминометилтимидин, который защитили трифторацетиллом и получили соединение 46. Реакция соединения 44 с цианидом калия в N,N-диметилформамиде дала 5'-(S)-С-цианметилтимидин, соединение 47. 5'-гидроксильные группы соединений 45-47 защитили диметокситритилом при помощи реакций с диметокситритилхлоридом и трифторметансульфонатом серебра в пиридине. Получили соединения 48-50, соответственно. Группы TBDMS соединений 48-50 удалили при помощи TBAF в тетрагидрофуране и получили соединения 51 - 53, соответственно. Соединения 51 - 53 преобразовали в соответствующие фосфорамидиты, соединения 54 - 56, соответственно. Реакция Гриньяра между соединением 42 и аллилбромидом магния дала смесь изомерных 5'-(R)-(С)-аллилтимидиновых и 5'-(S)-С-аллилтимидиновых производных, соединений 57 и 58, которые были разделены посредством хроматографии на силикагеле. Группы TBDMS соединений 57 и 58 удалили путем обработки TBAF в тетрагидрофуране и получили 5'-(R)- и 5'-(S)-С-аллилтимидины, соединения 59 и 60, соответственно. Соединения 59 - 60 преобразовали в соответствующие фосфорамидиты, соединения 61 - 62, соответственно. Подобным образом, реакции соединения 42 с различными реактивами Гриньяра дают различные 5'-(S или R)-С-алкилтимидины и 5'-(S или R)-С-алкенилтимидины.

Гидроборирование или окислительное расщепление полученных 5'-С-(соалкенил)-тимидинов дает гидроксиалкилтимидины, гидроксил которых можно преобразовать в различные функциональные группы, такие как NH₂, OR, SR, SH и X, где R - это H или алкил, а X - это F, Cl, Br, I, Ots. Реакции соединения 44 с разнообразными нуклеофильными реагентами дают целый ряд 5'-С-разветвленных тимидиновых производных. Так, реакции соединения 44 со спиртами в присутствии основания дают 5'-С-алкоксиметилтимидины. Для приготовления 5'-С-(замещенный алкокси)-тимидинов можно использовать спирты с замещениями. В неисчерпывающий перечень заместителей входят NO₂, CN, COOEt и защищенные аминогруппы. Реакции соединения 44 с двухатомными спиртами дают 5'-С-гидроксиалкоксиметилтимидины, которые можно легко преобразовать в 5'-С-галогеналкилтимидины. Реакция соединения 44 с нитрометаном дает 5'-С-нитроэтилтимидин. Восстановление 5'-С-нитроалкилтимидинов дает 5'-С-аминоалкилтимидины. Реакции соединения 44 с цианалкилкадмиевыми реагентами дает 5'-С-цианалкилтимидины. Реакции соединения 44 с этоксикарбонилалкилцинковыми реагентами дают 5'-С-этоксикарбонилалкилтимидины, которые легко гидролизуются в 5'-С-карбоксиалкилтимидины в щелочных условиях. Все преобразования, выполняемые с 5'-(S)-изомерами, возможны и для 5'-(R)-изомеров. И, наконец, реакции 5'-С-разветвленных тимидинов с диметокситритил хлоридом и трифлатом серебра в пиридине дают 5'-O-DMTr-5'-С-разветвленные тимидины, которые преобразуют в соответствующие фосфорамидиты при помощи стандартной процедуры (F. Eckstein, "Oligonucleotide synthesis", Oxford University Press (1991)). Для определения конфигурации в позиции C5' 5'-С-разветвленных тимидинов использовали увеличение NOE пространственно замкнутых протонов. Поскольку жесткая ориентация заместителей в позиции C5' очень важна для экспериментов с NOE, в тимидиновые производные между 3'-О- и 5'-О-ввели кольцо TIPDS (схема 8, Фиг. 11), где 5'-протоны ориентированы либо по направлению к 3'-протонам, либо от них. Когда 3'-протоны насыщены, можно легко наблюдать наличие или отсутствие увеличения NOE 5'-протонов (диаграмма 1, Фиг. 12). Для 5'-С-аллилтимидинов изомер с увеличением NOE на 4,8% - это определено 5'-(R)-изомер, а другой, без увеличения NOE, - 5'-(S)-изомер. Без помощи рентгеновской кристаллографии непосредственное определение стереохимии 5'-эпоксидной группы затруднительно. Однако, преобразование эпоксидов в продукты размыкания колец не изменяет хиральность в позиции C5'. Если стереохимия одной пары таких продуктов размыкания кольца определена, то можно определить и стереохимию эпоксидной пары. Так, аналогично 5'-С-аллилтимидинам, из эпоксидов была приготовлена пара продуктов размыкания кольца, 5'-С-цианметилтимидинов, и преобразована в продукты с TIPDS-кольцами. При насыщенном состоянии 3'-протонов один из изомеров продемонстрировал увеличение NOE на 6,3%. Следовательно, это 5'-(R)-изомер, а другой 5'-(S)-изомер.

Синтез 1'-С-разветвленных нуклеозидов

Имеются сообщения о ряде 1'-С-разветвленных нуклеозидов (a) Uteza, V., Chen, G-R., Tuoi, J.L.Q., Descotes, G., Fenet, B., Grouiller, A. Tetrahedron, 1993, 49, 8579 - 8588; b). Azhayev, A., Gouzaev, A., Hovinen, J., Azhayeva, E., Lonnberg, H. Tetrahedron Letts. 1993, 34, 6435 - 6438). Настоящим изобретением предусмотрены процедуры приготовления большого числа 1'-С-разветвленных нуклеозидов. Приготовление 1'-С-разветвленных нуклеозидов проиллюстрировано схемами 9 и 10 (Фиг. 13 и 14, соответственно). Соединение 63 получают в соответствии с известной процедурой (Uteza, V., Chen, G-R., Tuoi, J.L.Q., Descotes, G., Fenet, B., Grouiller, A. Tetrahedron, 1993, 49, 8579 - 8588). 5'-С-гидроксильную группу соединения 63 защищают диметокситритилом и получают соединение 64, которое обрабатывают трет-бутилдиметилхлорсиланом и получают соединение 65.

Обработка соединения 65 трет-бутилдиметилсилоксиметил хлоридом дает соединение 66. Обработка соединения 66 триэтоксиалюмогидридом лития в эфире дает альдегид, соединение 67. Восстановление

соединения 67 боргидридом натрия с последующей обработкой трифторметансульфоновым ангидридом дает трифлатное производное, соединение 68. Обработка соединения 68 различными нуклеофильными реагентами дает целый ряд новых 1'-С-разветвленных тимидинов, соединений 69. Так, обработка соединения 68 цианидом, нитритом или азидом натрия дает соответствующие 1'-С-цианметил-, 1'-С-нитрометил- и 1'-С-азидометилтимидины, соответственно. Обработка соединения 68 нитрометаном дает 1'-С-нитроэтил тимидин. Обработка соединения 68 алкоксидом натрия дает 1'-С-алкоксиметил тимидин. Обработка соединения 68 литий-медь-органическими реагентами дает 1'-С-алкил- и 1'-С-алкенилтимидины. Для приготовления 1'-С-(замещенный алкил)- и 1'-С-(замещенный алкенил)-тимидинов можно использовать алкил- или алкенилцинковые или кадмиевые реагенты с замещениями. В числе заместителей могут быть COOEt, CN, NO₂. Гидроборирование или окислительное расщепление полученных 1'-С-(ω-алкенил)тимидинов дает гидроксиалкилтимидины, гидроксил которых можно преобразовать в различные функциональные группы, такие как NH₂, OR, SR, SH и X, где R - это H или алкил, а X - это F, Cl, Br, I, Ots. Для приготовления 1'-С-алкоксиметил- и 1'-С-феноксиметилтимидинов можно использовать спирты и фенолы с замещениями. В числе заместителей могут быть NO₂, CN, COOEt или Oac. 1'-С-нитроалкилтимидины можно восстановить до соответствующих аминокислот. Соединение 69 обрабатывают TBAF и получают незащищенные соединения 70, которые преобразуют в соответствующие фосфорамидиты, соединения 71.

Соединение 63 полностью защищают р-метоксибензилом (MPM) и получают соединение 72. Гидролиз соединения 72 в присутствии перекиси водорода и основания дает соединение 73, которое подвергают перегруппировке Гофмана и получают амин, который при помощи метилбромидом можно преобразовать в четвертичное производное аммония, соединение 74. Триметиламин можно заменить различными нуклеофилами. Обработка соединения 74 алкоксидом натрия дает 1'-С-алкокситимидины. Обработка соединения 74 натрия алкилсульфидом дает 1'-С-алкилтиотимидины. При нагревании с бромидом натрия соединение 74 преобразуется в 1'-С-бромтимидин, который обрабатывают азидом натрия, нитритом натрия или нитрометаном и получают соответствующие 1'-С-замещенные тимидины. Соединения 75 обрабатывают церию аммония нитратом и получают незащищенные соединения 76. 5'-гидроксил защищают диметокситритилом, а полученные продукты, соединения 77, преобразуют в соответствующие фосфорамидиты, соединения 78.

Олигонуклеотиды, содержащие нуклеозиды с модифицированными сахарами

Недавно появились сообщения об олигонуклеотидах, содержащих нуклеозиды с модифицированными сахарами (A. Jorgensen, P.N., Stein, P.C., Wengel, J. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 2231; B. Fensholdt, J., Thrane, H., Wengel, J. Tetrahedron Letts. 1995, 36, 2535; C. Thrane, H., Fensholdt, J., Regner, M., Wengel, J. Tetrahedron, 1995, 51, 10389; D. Saha, A.K., Caulfield, T.J., Hobbs, C., Upson, D.A., Waychunas, C., Yawman, A.M. J. Org. Chem. 1995, 60, 788; E. Azhaye, A., Gouzaev, A., Hovinen, J., Azhaye, E., Lonnberg, H. Tetrahedron Lett. 1993, 34, 6435 - 6438; F. Ono, A., Dan, A., Matsuda, A. Bioconjugate Chemistry, 1993, 4, 499 - 508; G. Inoue, H., Hayase, Y., Imura, A., Iwai, S., Miuta, K., Ohtsuka, E., Nucleic Acids Res. 1987, 15, 6131; H. Lesnik, E.A., Guinasso, C.J., Kawasaki, A.M., Sasmor, H., Zounes, M., Cummins, L.L., Ecker D.J., Cook, P.O., and Freier, S.M. Biochemistry, 1993, 32, 7832). Настоящее изобретение обеспечивает создание большого числа новых нуклеозидов с модифицированными сахарами, которые легко можно включить в олигонуклеотиды при помощи фосфорамидитной химии. Олигонуклеотиды с модифицированными сахарами содержат хотя бы по одному нуклеозиду с модифицированным сахаром, предложенному настоящим изобретением; они могут содержать последовательность из нескольких нуклеозидов с модифицированными сахарами или только нуклеозиды с модифицированными сахарами, предложенные настоящим изобретением. Олигонуклеотиды с модифицированными сахарами могут содержать и другие модификации, например, в скелетах, в основаниях и другие модификации в сахарах. Очевидно, что разветвленные заместители в позициях 3' или 5' нуклеозидов снижают скорость соединения в зависимости от своего размера. Поэтому периоды соединения нуклеотидов с некоторыми громоздкими заместителями были продлены. Так, при синтезе 5'-С-разветвленных олигонуклеотидов и 4'-С-разветвленных олигонуклеотидов на соединение отводили 2 - 5 минут. При синтезе 3'-С-разветвленных олигонуклеотидов на соединение отводили 45 (3 x 15) минут. Повторные соединения со свежими реагентами необходимы только при синтезе 3'-С-разветвленных олигонуклеотидов, так как 3'-гидроксил является третичным. Состав очищенных олигонуклеотидов с модифицированными сахарами проверяли посредством анализа продуктов их переваривания ферментами.

Примеры

Изобретение, описанное выше, станет более понятным при обращении к нижеследующим примерам. Примеры иллюстрируют настоящее изобретение, но не ограничивают его объем.

Пример 1

Приготовление

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-р-тосилоксиметилтимидина

Раствор 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-гидроксиметилтимидина (2,12г, 3,69ммоль) приготовили в соответствии с известным способом (Jorgensen, P.N., Thrane, H., Wengel, J. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 2231). Р-толуолсульфонил хлорид (1,76г, 9,23ммоль), OMAP (0,180г, 1,48ммоль) в безводном пиридине перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь охладил до 0°C, разбавили EtOAc (500мл), промыли 10% раствором NaHCO₃, высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали. Сырой продукт очистили посредством хроматографии на силикагеле (5% CH₃OH в CH₂Cl₂) Получили 2,39г (89%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-р-тосилоксиметилтимидина в виде бесцветного порошка.

Пример 2

Приготовление

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-цианметилтимидина

Суспензию 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-р-толуолсульфонилоксиметилтимидина (0,50г, 0,686ммоль) и цианида калия (0,134г, 2,06ммоль) в безводном N,N-диметилформамиде (DMF) (7мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавили EtOAc (60мл) и промыли водой (3 x 75мл), затем 10% раствором NaHCO₃ (3 x 75мл). Органический слой высушили над Na₂SO₄, сконцентрировали, очистили посредством хроматографии на силикагеле (EtOAc-гексан, 1:1) и получили 0,386г (97%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-цианметилтимидина в виде бесцветного порошка.

Пример 3

Приготовление

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-азидометилтимидина

Суспензию 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-р-толуол-сульфонилоксиметилтимидина (0,40г, 0,55ммоль) и NaN₃ (0,11г, 1,65ммоль) в безводном N,N-диметилформамиде (3мл), нагревали до 50°C в течение 3 дней. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры, разбавили EtOAc (30мл) и промыли водой (3 x 40мл), затем 10% раствором NaHCO₃ (3 x 40мл). Органический слой высушили над Na₂SO₄, сконцентрировали, очистили посредством хроматографии на силикагеле (EtOAc-гексан, 1:1) и получили 0,30г (92%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-азидометилтимидина в виде бесцветного порошка.

Пример 4

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-цианметилтимидин

3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфорамидита)

К перемешиваемому раствору 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-цианметилтимидина (0,20г, 0,344ммоль) и диизопропилэтиламина (0,24мл, 1,38ммоль) в безводном дихлорметане (3мл) при 0°C в атмосфере аргона добавили по каплям раствор 2'-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидита (170мг, 0,715ммоль) в дихлорметане. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, охладили до 0°C, разбавили холодным CH₂Cl₂ (20мл), промыли холодным NaHCO₃ (3 x 40мл). Органический слой высушили над Na₂SO₄, сконцентрировали. Остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (Et₃N-EtOAc-CH₂Cl₂, 5:50:45). Получили 177мг (66%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-цианметилтимидин 3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфорамидита) в виде пены.

Пример 5

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-азидометилтимидин

3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфорамидита)

К перемешиваемому раствору 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-азидометилтимидина (252мг, 0,344ммоль) и диизопропилэтиламина (0,44мл, 2,51ммоль) в безводном дихлорметане (3мл) при 0°C в атмосфере аргона добавили по каплям раствор 2'-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (296мг, 1,25ммоль) в дихлорметане. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, охладили до 0°C, разбавили в холодном CH₂Cl₂ (20мл) и промыли холодным NaHCO₃ (3 x 15мл). Органический слой высушили над Na₂SO₄, сконцентрировали. Остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (Et₃N-EtOAc-CH₂Cl₂, 5:50:45). Получили 128мг (38%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-азидометилтимидин 3'-(2-азидометил-N,N-диизопропилфосфорамидита) в виде пены.

Пример 6

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-метилентимидина

К суспензии NaN (60% в минеральном масле, 0,18г; 7,5ммоль) в безводном тетрагидрофуране (18мл) при 0°C в атмосфере аргона добавили по каплям раствор 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-р-толуолсульфонилоксиметилтимидина (1,5г, 2,06ммоль) в тетрагидрофуране (10мл). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, охладили до 0°C и погасили при помощи воды. Смесь разбавили EtOAc (250мл), промыли водой (2 x 200мл), затем 10% раствором NaHCO₃ (2 x 200мл), высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали. Остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (5% CH₃OH в CH₂Cl₂). Получили 0,97г (85%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-метилентимидина в виде пены.

Пример 7

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-метилтимидина

К перемешиваемой суспензии алюмогидрида лития (58мг; 1,53ммоль) в безводном тетрагидрофуране (10мл) при 0°C в атмосфере аргона добавили по каплям раствор 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С,О-метилентимидина (385мг, 0,692ммоль) в тетрагидрофуране (10мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа, и реакцию погасили, медленно добавляя 10% раствор NaHCO₃. Полученную смесь разбавили EtOAc (30мл), промыли NaHCO₃ (3 x 20мл), высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали. Остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (5% CH₃OH в CHCl₃). Получили 306мг (79%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-метилтимидина в виде пены.

Пример 8

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-метилтимидин

3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфорамидита)

К перемешиваемому раствору 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-метилтимидина (98мг, 0,17ммоль) и диизопропилэтиламина (0,13мл, 0,742ммоль) в безводном дихлорметане (2мл) при 0°C в атмосфере аргона добавляли по каплям раствор 2'-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидита (85мг, 0,36ммоль) в дихлорметане. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, охладили до 0°C, разбавили холодным CH₂Cl₂ (20мл), промыли холодным NaHCO₃ (3 x 15мл). Органический

слой высушили над Na_2SO_4 , сконцентрировали. Остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (Et₃N-EtOAc-гексан 5:50:45). Получили 117мг (88%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-метилтимидин 3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфорамидита) в виде пены.

Пример 9

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-аминометилтимидина

К раствору 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С,О-метилентимидина (901мг, 1,62ммоль) в метаноле (3мл) добавили насыщенный раствор аммиака в метаноле (9мл), и полученный раствор выдержали при комнатной температуре в течение 3 дней. Избыток аммиака и метанола выпарили, и остаток очистили посредством хроматографии (CH_3OH -гексан- CHCl_3 1:1:8). Получили 414мг (45%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-аминометилтимидина в виде бесцветного твердого вещества.

Пример 10

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-трифторацетамидометилтимидина

Раствор 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-аминометилтимидина (361мг, 0,628ммоль) и этилтиотрифторацетата (490мг, 3,12ммоль) в безводном тетрагидрофуране (6мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов. Растворитель выпарили, и остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (5% CH_3OH в CH_2Cl_2). Получили 411мг (98%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-трифторацетамидометилтимидина в виде бесцветного порошка.

Пример 11

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-трифторацетамидометил-тимидин 3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфорамидита)

К перемешиваемому раствору 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-метилтимидина (411мг, 0,614ммоль) и диизопропилэтиламина (0,64мл, 3,65ммоль) в безводном дихлорметане (6мл) при 0°C в атмосфере аргона добавили по каплям раствор 2'-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (410мг, 1,83ммоль) в безводном дихлорметане. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, охладили до 0°C, разбавили холодным CH_2Cl_2 (30мл), промыли холодным NaHCO_3 (3 x 20мл). Органический слой высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали. Остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (Et₃N-EtOAc- CHCl_3 , 5:30:65). Получили 386мг (72%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-3'-С-трифторацетамидометил-тимидин 3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфорамидита) в виде порошка.

Пример 12

Приготовление 3'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-формилтимидина

К перемешиваемому холодному раствору 3'-О-(4,4'-диметокситритил)-тимидина (полученному из тимидина обычным способом, 40,4г, 0,072ммоль) в безводном ДМСО (DMSO) добавили раствор дициклогексилкарбодиимиды (DCC) (45,86г, 0,224мол) в ДМСО (180мл). Полученный раствор перемешивали при 5°C в течение 5 минут, добавили пиридин (2,94г, 3,0мл, 0,0371ммоль) и после перемешивания в течение следующих 5 минут по каплям добавили раствор трифторуксусной кислоты (2,11г, 1,43мл, 0,0185мол) в ДМСО (2мл). Полученную реакционную смесь перемешивали при 5°C в течение 10 минут и при комнатной температуре в течение 6 часов. Воду (20мл) добавили по каплям при охлаждении, и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Осадки отфильтровали и промыли ДМСО. Объединенный раствор ДМСО вылили на дробленый лед (4л) при перемешивании. Осадки выдержали в течение часа, отфильтровали и обильно промыли водой. Фильтровальный осадок растворили в метиленхлориде (500мл), органический слой отделили, высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали. Сырой остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (3% метанола в метиленхлориде). Получили 32,6г (81%) 3'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-формилтимидина в виде бесцветного порошка.

Пример 13

Приготовление 3'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-гидроксиметилтимидина

К перемешиваемому раствору 3'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-формилтимидина (16,3г, 30,07ммоль) в диоксане (120мл) при 0°C добавили по каплям, по очереди, 36% формальдегида (24мл) и 2N NaOH (60мл). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов. Реакционную смесь охладили до 0°C, и по каплям добавляли 10% раствор уксусной кислоты в воде, пока не довели pH до 7,5. Смесь разбавили этилацетатом (1л), промыли 10% соляным раствором (500мл, затем 2 x 300мл), высушили (Na_2SO_4) и сконцентрировали. Сырой остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (EtOAc-гексан, 3:1). Получили 11,45г (66,3%) 3'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-гидроксиметилтимидина в виде бесцветного порошка.

Пример 14

Приготовление 4'-С-гидроксиметилтимидина

Раствор 3'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-гидроксиметилтимидина (6,32г, 11,0ммоль) в 80% водном растворе уксусной кислоты (50мл) выдержали при комнатной температуре в течение 4 часов. Растворители удалили при пониженном давлении, и добавили воду (200мл). Полученную непрозрачную смесь промыли эфиром (3 x 80мл), и воду выпарили. Остаток растворили в метаноле и толуоле, и полученный раствор сконцентрировали. Этот процесс повторили дважды. 4'-С-гидроксиметилтимидин (2,72г, 91%) получили в виде пены.

Пример 15

Приготовление 4'-С-бензоилоксиметилтимидина

К перемешиваемому раствору 4'-С-гидроксиметилтимидина (3,72г, 13,67ммоль) в безводном пиридине (10мл) при комнатной температуре добавили раствор бензангидрида (4,64г, 51ммоль) в пиридине (10мл).

Полученный раствор выдержали при 0°C в течение 1 часа и затем при комнатной температуре в течение 20 часов. Добавили воду (5мл) при 0°C, выпарили пиридин, и остаток подвергли хроматографии на силикагеле (7% этанол в хлороформе). Получили 2,27г (44%) 4'-С-бензоилоксиметилтимидина в виде бесцветного твердого вещества.

Пример 16

Приготовление 3',5'-О-(бис-тетрагидропиранил)-4'-С-гидроксиметилтимидина

К перемешиваемому раствору 4'-С-бензоилоксиметилтимидина (1,65г, 4,39ммоль) и р-толуолсульфокислоты (50мг) в безводном метиленхлориде (70мл) при 0°C по каплям добавили дигидропиран (1,84г, 1,89ммоль, 21,80ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. 2N NaOH (20мл) добавили при охлаждении. Для удаления метиленхлорида полученную смесь сконцентрировали, и добавили диоксан (10мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов и экстрагировали метиленхлоридом (3 x 30мл). Органический слой промыли водой (3 x 50мл), высушили (Na₂SO₄) и сконцентрировали. Остаток очистили посредством фильтрации на колонке с силикагелем. Получили 1,50г (77,7%) 3',5'-О-(бис-тетрагидропиранил)-4'-С-гидроксиметилтимидина в виде пены.

Пример 17

Приготовление 4'-С-метоксиметилтимидина

К перемешиваемому раствору 3',5'-О-(бис-тетрагидропиранил)-4'-С-гидроксиметилтимидина (660мг, 1,5ммоль) и гидрида натрия (60% в минеральном масле, 180мг, 4,5ммоль) в безводном тетрагидрофуране (15мл) при 0°C по каплям добавили иодид метила (1,06г, 0,46мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 часов. По каплям добавили воду (1мл) при 0°C, и довели pH до 7 при помощи уксусной кислоты. Смесь разбавили этилацетатом (50мл), промыли водой (3 x 30мл), высушили (Na₂SO₄) и сконцентрировали. Остаток растворили в кислой смеси (5мл тетрагидрофурана (THF), 10мл CH₃COOH и 5мл воды), раствор выдержали при 50°C в течение 3 часов, растворители выпарили, остаток растворили в смеси метанол-толуол, сконцентрировали и все повторили еще раз. Очистили посредством хроматографии на силикагеле (10% этанол в хлороформе). Получили 271 мг (63%) 4'-С-метоксиметилтимидина в виде бесцветного твердого вещества.

Пример 18

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-метоксиметилтимидина

Раствор 4'-С-метоксиметилтимидина (173мг, 0,6ммоль) и диметокситритилхлорида (287мг, 0,84ммоль) в пиридине выдержали при комнатной температуре в течение 5 часов. Пиридин выпарили, и остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (EtOAc-гексан, 2:1). Получили 264мг (74%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-метоксиметилтимидина в виде пены.

Пример 19

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-метоксиметилтимидин 3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфорамида)

К перемешиваемому раствору 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-метоксиметилтимидина (200мг, 0,34ммоль) и диизопропилэтиламина (176мг, 236мкл, 1,36ммоль) в безводном метиленхлориде (3мл) при 0°C в атмосфере азота добавили по каплям раствор 2'-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамида (161мг, 152мкл, 0,68ммоль) в метиленхлориде (1мл). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут, охладили до 0°C, разбавили этилацетатом (30мл). Смесь промыли 10% раствором NaHCO₃ (3 x 20мл), высушили (Na₂SO₄) и сконцентрировали. Остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (Et₃N-EtOAc-гексан, 5:45:50). Получили 190мг (71%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-метоксиметилтимидин 3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфорамида) в виде пены.

Пример 20

Приготовление 3',5'-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-гидроксиметилтимидина

К холодному перемешиваемому раствору 4'-С-бензоилметилтимидина (1,14г, 3,03ммоль) и имидазола (985мг, 15,15ммоль) в пиридине добавили раствор трет-бутилдиметилхлорсилана (1,37г, 9,09ммоль) в пиридине. Реакцию выдержали при 50°C в течение ночи, разбавили этилацетатом (100мл), промыли водой (3x 50мл), сконцентрировали. Остаток растворили в этаноле (10мл), и добавили смесь этилендиамина и этанола (1:1, 20мл). Раствор нагревали до 50°C в течение 2 дней. Этанол и этилендиамин выпарили при пониженном давлении, и остаток растворили в хлороформе (60мл). Раствор промыли водой (3 x 40мл), высушили (N32804) и сконцентрировали. Остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (EtOAc-гексан, 1:1). Получили 780мг (52%) 3',5'-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-гидроксиметилтимидина в виде белого твердого вещества.

Пример 21

Приготовление 3',5'-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-аминометилтимидина

К перемешиваемому раствору 3',5'-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-гидроксиметилтимидина (500мг, 1ммоль) и пиридина (0,4мл) в безводном метиленхлориде (5мл) при 0°C добавили по каплям смесь трифторметансульфонового ангидрида (564мг, 332мкл, 2,0ммоль) и пиридина (0,4мл) в метиленхлориде (5мл). Полученную реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 минут, и добавили 0,5мл 10% раствора NaHCO₃ при -10°C. Смесь разбавили метиленхлоридом (20мл), промыли холодным 10% NaHCO₃ (2 x 30мл), высушили (Na₂SO₄), сконцентрировали и сушили в вакууме в течение 1 часа. Сырой остаток растворили в диоксане (30мл) и подвергли сатурации газообразным аммиаком. Раствор выдержали при комнатной температуре в течение ночи и затем держали нагретым при 50°C в течение 2 дней. Избыток аммиака и диоксана выпарили, и остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (1% MeOH и 5% Et₃N- в CHCl₃).

Получили 266мг (53%) 3',5'-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-аминометилтимидина в виде белого вещества.

Пример 22

Приготовление 3',5'-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-трифторацетамидометилтимидина

Раствор 3',5'-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-аминометилтимидина (260мг, 0,52ммоль) и этилтиотрифторацетата (635мг, 0,52ммоль) в диоксане перемешивали при комнатной температуре в течение 5 часов. Растворитель выпарили, и остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (5% метанола в хлороформе). Получили 220мг (71%) 3',5'-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-трифторацетамидометилтимидина в виде белого твердого вещества.

Пример 23

Приготовление 4'-С-трифторацетамидометилтимидина

Раствор 3',5'-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-трифторацетамидометилтимидина (215мг, 0,36ммоль) и ТВАФ (1,0М в тетрагидрофуране, нейтрализованный уксусной кислотой до pH = 7,5, 0,72мл) в тетрагидрофуране выдерживали при комнатной температуре в течение 20 часов. Растворитель выпарили, и остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (10% метанола в хлороформе). Получили 118мг (89%) 4'-С-трифторацетамидометилтимидина в виде бесцветного твердого вещества.

Пример 24

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-трифторацетамидометилтимидина

Раствор 4'-С-трифторацетамидометилтимидина (110мг, 0,3ммоль) и диметокситритилхлорида (152мг, 0,45ммоль) в безводном пиридине (2мл) выдерживали при комнатной температуре в течение ночи. Пиридин выпарили, и остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (EtOAc-гексан, 2:1). Получили 122мг (61%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-трифторацетамидометилтимидина в виде пены.

Пример 25

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-трифторацетамидометил-тимидин

3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфорамидита)

К перемешиваемому раствору 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-трифторацетамидометил-тимидина (110мг, 0,165ммоль) и диизопропилэтиламина (129мг, 1,74ммоль) в безводном метиленхлориде (3мл) при 0°C в атмосфере азота добавили по каплям раствор 2'-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (78мг, 0,33ммоль) в метиленхлориде (1мл). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут, охладили до 0°C, разбавили этилацетатом (20мл). Смесь промыли 10% раствором NaHCO₃ (3 x 15мл), высушили (Na₂SO₄) и сконцентрировали. Остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (Et₃N-EtOAc-гексан, 5:45:50). Получили 137мг (86%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-4'-С-трифторацетамидометил-тимидин 3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфорамидита) в виде пены.

Пример 26

Приготовление 3',5'-О-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-азидометилтимидина

К перемешиваемому раствору 3',5'-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-гидроксиметилтимидина (0,95г, 0,19ммоль) и пиридина (0,1мл) в безводном метиленхлориде (1мл) при 0°C добавили по каплям смесь трифторметансульфонового ангидрида (107мг, 63мкл, 0,38ммоль) и пиридина (0,2мл) в метиленхлориде (2,5мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 минут, охладили до -10°C, и добавили 0,5мл 10% раствора NaHCO₃. Смесь разбавили холодным метиленхлоридом (10мл), промыли холодным 10% раствором NaHCO₃ (2 x 10мл), высушили (Na₂SO₄), сконцентрировали и сушили в вакууме в течение 10 минут. Сырой остаток растворили в безводном N,N-диметилформамиде (1мл), и добавили азид натрия (50мг). Раствор держали нагретыми при 50°C в течение 14 часов, разбавили этилацетатом (20мл), промыли водой (2 x 10мл), высушили (Na₂SO₄) и сконцентрировали. Остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (10% этилацетат в метиленхлориде). Получили 42мг 3',5'-О-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-азидометилтимидина в виде пены.

Пример 27

Приготовление 4'-С-азидометилтимидина

Раствор 3',5'-О-(бис-трет-бутилдиметилсилил)-4'-С-азидометилтимидина (25мг) и ТВАФ (1,0М в тетрагидрофуране, 0,5мл) в тетрагидрофуране (1мл) выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут. Растворитель выпарили, и остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (6% MeOH в CH₂Cl₂). Получили 11мг 4'-С-азидометилтимидина в виде бесцветного твердого вещества.

Пример 28

Приготовление 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-дезоксид-5'-метилидентимидина

Суспензия гидроксида натрия (60% в минеральном масле, 2,88г, 72ммоль) в безводном ДМСО (100мл) после перемешивания при 65°C в течение 1,5 часа в атмосфере азота превратилась в прозрачный раствор, который охладили до комнатной температуры и перенесли в холодную перемешиваемую суспензию метилтрифенилфосфония бромид (27,0г, 75,6ммоль) в ДМСО (20мл) в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 минут, с одновременным охлаждением добавили раствор 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-дезоксид-5'-формилтимидина (8,50г, 24ммоль) в ДМСО (40мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, разбавили этилацетатом (2л), промыли соляным раствором, высушили (Na₂SO₄), сконцентрировали. Сырой остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (EtOAc-гексан, 30:70). Получили 6,79г (80,2%) 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-дезоксид-5'-метилидентимидина в виде бесцветного твердого вещества, точка плавления 122°C (перекристаллизация из этилацетата и гексана).

Пример 29

Приготовление 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-С,О-метилентимидина

Раствор 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-дезоксид-5'-метилентимидина (6,26г, 17,78ммоль) и м-хлорнафтоуксусной кислоты (4,61г, 26,68ммоль) в метиленхлориде (160мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, разбавили метиленхлоридом (200мл), промыли 10% раствором NaHCO_3 (2 x 240мл) и затем соляным раствором (160мл), высушили (Na_2SO_4) и сконцентрировали. Остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (EtOAc -гексан, 1:2). Получили неизменный исходный материал (2,25г, 35,9%), 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(S)-С,О-метилентимидин (3,2г, 76%) и 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(R)-С,О-метилентимидин (0,365г, 8%).

Пример 30

Приготовление 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-С-метоксиметилтимидина

Раствор 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(R)-С,О-метилентимидина (1,84г, 5ммоль) и безводного карбоната калия (1,38г, 10ммоль) в метаноле перемешивали при комнатной температуре в течение 90 часов. Добавили этилацетат (70мл), и смесь нейтрализовали уксусной кислотой до $\text{pH} = 7$. Растворители выпарили, и остаток растворили в метиленхлориде (30мл). Осадки отфильтровали, и раствор сконцентрировали. Остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (EtOAc -гексан, 1:1). Получили 310мг неизменного исходного материала и 578мг 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-С-метоксиметилтимидина в виде бесцветного твердого вещества.

Пример 31

Приготовление 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-С-трифторацетамидометилтимидина

Раствор 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(R)-С,О-метилентимидина (0,84г, 2,28ммоль) в метаноле перемешивали с раствором метанола, насыщенным аммиаком (10мл). Полученный раствор выдержали при комнатной температуре в течение 15 часов, и затем избыток аммиака и метанола выпарили. Сухой остаток растворили в диоксане (10мл), и добавили этилтрифторацетат (1,80г, 11,4ммоль, 1,46мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов, и затем растворитель выпарили. Остаток подвергли хроматографии на силикагеле (EtOAc -гексан, 1:1). Получили 895мг (81,8%) 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-С-трифторацетамидометилтимидина в виде бесцветного твердого вещества.

Пример 32

Приготовление 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(S)-С-цианметилтимидина

Смесь 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(R)-С,О-метилентимидина (0,77г, 2,09ммоль) и цианид калия (520мг, 8,0ммоль) в N,N-диметилформамиде (10мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 40 часов, разбавили этилацетатом (100мл), промыли соляным раствором (5 x 60мл), высушили (Na_2SO_4) и сконцентрировали. Сырой остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (EtOAc -гексан, 1:1). Получили 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(S)-С-цианметилтимидин (580мг, 70%) в виде белого твердого вещества.

Пример 33

Приготовление 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(S)-С-азидометилтимидина

Смесь 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(R)-С,О-метилентимидина (3683мг, 1,0ммоль) и цианида калия (325мг, 5,0ммоль) в N,N-диметилформамиде (3мл) выдерживали нагретыми при 50°C в течение 16 часов, разбавили этилацетатом (60мл), промыли соляным раствором (5x 40мл), высушили (Na_2SO_4) и сконцентрировали. Сырой остаток очистили посредством хроматографии на силикагеле (EtOAc -гексан, 1:1). Получили 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(S)-С-азидометилтимидин (173мг, 42%) в виде белого твердого вещества.

Пример 34

Приготовление

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-С-аллилтимидинов

К суспензии безводного цианида меди (7,57г, 84,7ммоль) в безводном тетрагидрофуране при -5°C в атмосфере аргона добавили по каплям аллилбромид магния (2,0М в тетрагидрофуране, 46,6мл, 93,2ммоль). Суспензию перемешивали в течение 15 минут при -5°C и по каплям добавляли холодный раствор 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-формилтимидина (5,0г, 14,12ммоль) в тетрагидрофуране (200мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов, погасили, добавив 10% раствор NaHCO_3 (150мл) при 0°C, и разбавили этилацетатом (200мл). Органический слой промыли 10% раствором NaHCO_3 (2 x 150мл), высушили (Na_2SO_4) и сконцентрировали. Получили 5,18г сырых 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-С-аллилтимидинов (содержащих два изомера: 5'-(R) и 5'-(S)). Два изомера (соотношение 1:1) были разделены посредством хроматографии на силикагеле (15% EtOAc в CHCl_3).

Пример 35

Приготовление 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-метоксиметилтимидинов

Смесь 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-С-метоксиметилтимидина (258мг, 0,645ммоль), диметокситритилхлорида (1,09г, 3,22ммоль) и трифторметансульфонового ангидрида серебра (835мг, 3,22ммоль) в безводном пиридине (3мл) выдержали нагретой при 50°C в течение 18 часов. Пиридин выпарили, и остаток подвергли хроматографии на силикагеле (EtOAc -гексан, 1:1). Получили 372мг (82%) 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-метоксиметилтимидинов в виде белого твердого вещества.

Подобным образом были приготовлены следующие вещества:

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-цианметилтимидин был получен из

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(S)-С-цианметилтимидина;

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-азидометилтимидин был получен из

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(S)-С-азидометилтимидина;

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-аллилметилтимидин был получен из

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(S)-С-аллилметилтимидина;

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(R)-С-аллилметилтимидин был получен из

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(R)-С-аллилметилтимидина;

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-трифторацетамидометилтимидин был

получен из 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-(S)-С-трифторацетамидометилтимидина;

Пример 36

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-метоксиметилтимидинов

Раствор 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-метоксиметилтимидина (825мг, 1,17ммоль) и TBAF (1,0М в тетрагидрофуране, 3,6мл, 3,6ммоль) в тетрагидрофуране (15мл) выдерживали при

комнатной температуре в течение 2 часов. Тетрагидрофуран выпарили, и остаток подвергли хроматографии на

силикагеле (EtOAc-гексан, 3:2). Получили 551мг (80%)

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-метоксиметилтимидинов.

Подобным образом были приготовлены следующие вещества:

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-цианметилтимидин был получен из

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-цианметилтимидина;

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-азидометилтимидин был получен из

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-азидометилтимидина;

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-аллилметилтимидин был получен из

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-аллилметилтимидина;

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(R)-С-аллилметилтимидин был получен из

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(R)-С-аллилметилтимидина;

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-трифторацетамидометилтимидин был получен из

3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-трифторацетамидометилтимидина.

Пример 37

Приготовление 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-метоксиметилтимидин

3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфoramидитов)

К раствору 3'-О-трет-бутилдиметилсилил-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-метоксиметилтимидина (490мг, 0,83ммоль), диизопропилэтиламина (646мг, 0,87мл, 5,0ммоль) в безводном дихлорметане (5мл) при 0°C в

атмосфере азота добавили малыми каплями раствор 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфoramидита (592мг, 2,5ммоль, 558мкл) в дихлорметане (1мл). Раствор перемешали при комнатной температуре в течение 40минут,

охладили до 0°C, растворили в дихлорметане (60мл), промыли холодным 5% раствором NaHCO₃ (3 x 40мл), высушили (Na₂SO₄) и сконцентрировали. Остаток подвергли хроматографии на силикагеле (EtAN-EtOAc-гексан, 5:45:50). Получили 584мг (89%) 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-метоксиметилтимидины

3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфoramидита) в виде пены.

Подобным образом были приготовлены следующие вещества:

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-цианметилтимидин 3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфoramидит) был приготовлен из 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-цианметилтимидина;

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-азидометилтимидин 3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфoramидит)

был приготовлен из 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-азидометилтимидина;

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-аллилметилтимидин 3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфoramидит)

был приготовлен из 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-аллилметилтимидина;

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(R)-С-аллилметилтимидин 3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфoramидит)

был приготовлен из 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(R)-С-аллилметилтимидина;

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-трифторацетамидометилтимидин

3'-(2-цианэтил-N,N-диизопропилфосфoramидит) был приготовлен из

5'-О-(4,4'-диметокситритил)-5'-(S)-С-трифторацетамидометилтимидина.

Пример 38

Приготовление 1'-циан-3'-трет-бутилдиметилсилил-5'-(4,4'-диметокситритил)-тимидина

1'-циан-5'-(4,4'-диметокситритил)-тимидин в безводном пиридине добавили к перемешиваемому раствору трет-бутилдиметилхлорсилана (1,5 эквивалента) и имидазола (3,5 эквивалента) в безводном пиридине при 0°C.

Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Пиридин выпарили, и остаток растворили в этилацетате, промыли соляным раствором. Сырой продукт непосредственно использовали в следующей реакции.

Пример 39

Приготовление 3'-трет-бутилдиметилсилил-5'-диметокситритил-1'-формил-5-метоксибензилтимидина

3'-трет-бутилдиметилсилил-1'-циан-5'-диметокситритил-5-(p-метоксибензил)-тимидин (1,0ммоль) в тетрагидрофуране добавили к перемешиваемому раствору триэтоксисиломогидрида лития (2,0ммоль) в тетрагидрофуране при -20°C в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при 5 - 10°C в течение 1

часа, погасили водным раствором хлорида аммония. Смесь экстрагировали этилацетатом, и сырой продукт подвергли хроматографии на силикагеле.

Пример 40

Приготовление 1'-амидо-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидина

1'-амидо-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидин добавили к перемешиваемому водному раствору 30% перекиси водорода и карбоната натрия при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, разбавили водой, нейтрализовали, добавив соляную кислоту, экстрагировали дихлорметаном. Сырой продукт очистили посредством хроматографии.

Пример 41

Приготовление 1'-амино-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидина

Процесс приготовления такой же, как описан в литературе (Radhakrishna, A.S., Parham, M.E., Riggs, R.M. and Loudon, G.M. J. Org. Chem. 1979, 44, 1746). 1'-циан-3',5',5'-трис(метоксибензил)тимидин (1,0ммоль) в безводном тетрагидрофуране добавили к перемешиваемому раствору 1,1-бис-(трифторацетоксидбензола (2,0ммоль) в тетрагидрофуране при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 часов, разбавили дихлорметаном, промыли 5% карбонатом натрия и соляным раствором. Сырой продукт очистили посредством хроматографии.

Пример 42

Приготовление триметил-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидин-1'-ил аммония бромида

1'-амино-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидин добавили к перемешиваемому раствору метилбромида (10 эквивалентов) в тетрагидрофуране при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение ночи. Растворитель выпарили, и сырой продукт очистили посредством перекристаллизации.

Пример 43

Приготовление 1'-бром-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидина

Процесс приготовления такой же, как описан в литературе (Deady, L.W., Korytsky, O.L. Tetrahedron Lett. 1979, 451). Триметил-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидин-1-ил аммония бромид выдержали нагретым при 150°C в вакууме в течение ночи. Сырой продукт непосредственно использовали в следующей реакции.

Пример 44

Приготовление 1'-этокси-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидина

1'-бром-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидин в этаноле добавили к перемешиваемому раствору этиоксида натрия в этаноле при -10°C. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, нейтрализовали разбавленной соляной кислотой. Этанол выпарили, и оставшуюся реакционную смесь экстрагировали этилацетатом. Сырой остаток очистили посредством хроматографии. Получили смесь α и β диастереомеров.

Подобным образом были приготовлены следующие вещества:

1'-(4-нитробутоксид)-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидин из 1'-бром-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидина и 4-нитрибутанола-1.

1'-этилтио-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидин был приготовлен из 1'-бром-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидина и тиоэтоксид натрия.

Пример 45

Приготовление 1'-амино-тимидина

Суспензию 1'-амино-3',5',5'-трис-(метоксибензил)-тимидина и 10% палладированного угля в этаноле встряхивали в устройстве для гидрогенизации при давлении водорода 344,7кПа в течение ночи. Твердое вещество отфильтровали, и фильтрат сконцентрировали. Сырой продукт очистили посредством перекристаллизации.

Пример 46

Приготовление олигонуклеотидов с модифицированными сахарами

Этот пример иллюстрирует использование соединения 55 (Фиг. 8) в ходе синтеза произвольного олигонуклеотида с такой последовательностью:

5'-d(ATC TCT CCG CTT CTT* TT* C)-3'

В этой последовательности A, C, G и T обозначают немодифицированные дезоксирибонуклеозиды, а T* обозначает 5'-С-аминометилтимидин. В этом примере синтез олигонуклеотидов проводили в синтезаторе ДНК ABI 394 (Applied Biosystems, модель 394). Все нуклеозиды присоединяли по принципам фосфорамидитной химии. Присоединение dA, dC, dG и T осуществляли при помощи стандартных для синтеза ДНК реагентов в соответствии со стандартной процедурой. Из-за стерических помех, создаваемых разветвленным заместителем в позиции C5' тимидина присоединение T* происходило дольше (5минут). По окончании синтеза обработку олигонуклеотида проводили стандартным способом. Сырой олигонуклеотид очистили на обращенно-фазной колонке C18 Beckman посредством ЖХВР с буфером TEAA (pH 7,0) и ацетонитрилом в качестве подвижной фазы. Получили очищенный олигонуклеотид, оптическая плотность 62,4.

Подобным образом были приготовлены следующие произвольные олигонуклеотиды с модифицированными сахарами.

5'-С-разветвленные олигонуклеотиды с модифицированными сахарами:

1. 5'-TTCCTGTCTGATGGCTTC-3'
 - 5 2. 5'-~~XX~~CCTGTCTGATGGCTTC-3'
 3. 5'-TTCCTGTCT~~X~~GATGGCTTC-3'
 4. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTTC-3'
 - 10 5. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~XC~~-3'
 6. 5'-ATCTCTCCGCTTCCT~~XXC~~-3'
 7. 5'-ATCTC~~X~~CCGCT~~XC~~CTTTC-3'
 - 15 8. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~YC~~-3'
 9. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~YYC~~-3'
 10. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~YC~~-3'
 - 20 11. 5'-A~~Y~~CTC~~Y~~CCGCT~~Y~~CCTT~~YC~~-3'
 12. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~ZC~~-3'
 - 25 13. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~ZZC~~-3'
 14. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~ZZC~~-3'
 15. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~V~~C-3'
 - 30 16. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~V~~V-3'
 17. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~V~~V-3'
 18. 5'-ATCTC~~V~~CCGCTTCCTTTC-3'
 - 35 19. 5'-A~~V~~CTCTCCGCTTCCTTTC-3'
 20. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~W~~C-3'
 21. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~WW~~C-3'
 - 40 22. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~W~~W-3'
 23. 5'-ATCTC~~W~~CCGCTTCCTTTC-3'
 - 45 24. 5'-A~~W~~CTCTCCGCTTCCTTTC-3'
- X** = 5'-(S)-C-метоксиметилтимидин,
Y = 5'-(S)-C-аминометилтимидин,
50 **Z** = 5'-(S)-C-цианметилтимидин,
V = 5'-(S)-C-аллилтимидин, и
55 **W** = 5-(R)-C-аллилтимидин.

4'-С-разветвленные олигонуклеотиды с модифицированными сахарами:

25. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTTC-3'
26. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~X~~C-3'
27. 5'-ATCTCTCCGCTTCCT~~XX~~C-3'
28. 5'-ATCTCTCCGCTTCCT~~XT~~C-3'
29. 5'-A~~X~~CTCTCCGCTTCCTTTC-3'
30. 5'-ATCTC~~X~~CCGCTTCCTTTC-3'
31. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~Y~~C-3'
32. 5'-ATCTCTCCGCTTCCT~~YX~~C-3'
33. 5'-ATCTCTCCGCTTCCT~~YT~~C-3'
34. 5'-A~~Y~~CTCTCCGCTTCCT~~XT~~C-3'
35. 5'-ATCTC~~Y~~CCGCTTCCTTTC-3'

X = 4'-С-метоксиметилтимидин,

Y = 4'-С-аминометилтимидин.

3'-С-разветвленные олигонуклеотиды с модифицированными сахарами:

36. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTTC-3'
37. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~X~~C-3'
38. 5'-ATCTCTCCGCTTCCT~~XX~~C-3'
39. 5'-ATCTCTCCGCTTCCT~~XT~~C-3'
40. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTTC-3'
41. 5'-A~~X~~CTCTCCGCTTCCTTTC-3'
42. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~Y~~C-3'
43. 5'-ATCTCTCCGCTTCCT~~YY~~C-3'
44. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTTC-3'
45. 5'-A~~Y~~CTCTCCGCTTCCT~~XT~~C-3'
46. 5'-ATCTC~~Y~~CCGCTTCCTTTC-3'
47. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTT~~Z~~C-3'
48. 5'-ATCTCTCCGCTTCCT~~ZZ~~C-3'
49. 5'-ATCTCTCCGCTTCCT~~ZT~~C-3'

X = 3'-С-аминометилтимидин,

Y = 3'-Р-метилтимидин,

Z = 3'-Р-цианметилтимидин.

Включение посредством ссылки

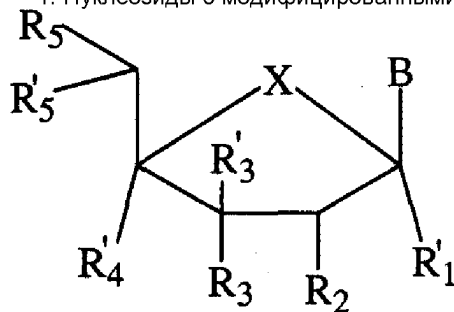
Все патенты, патентные заявки и публикации, упомянутые в настоящем документе, включаются в него посредством ссылки.

Эквиваленты

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

Формула винаходу

1. Нуклеозиды с модифицированными сахарами общей формулы



где В - нуклеозидное основание, такое, как тимин, любая арильная составляющая R'_1 , R'_3 , R'_4 и R'_5 представляет собой фенил, полицикл или гетероцикл;

R_2 - H, X - S, O, CH_2 ,

и, если

(I) R_3 и R_5 независимо выбраны из группы, состоящей из OH, 2-цианоэтил-(N, N-диизопропил) фосфорамидитной или гидроксиглобирующей группы, то

(A) X представляет S, CH_2 ;

R'_1 , R'_3 , R'_4 и R'_5 независимо выбраны из группы, состоящей из H, CN, N_3 , NO_2 , CF_3 , алкила C_1-C_{10} , при условии, что R'_1 , R'_3 , R'_4 и R'_5 не могут быть одновременно H, а алкил может быть замещен одной из групп CN, NH_2 , OH, Br, SO_3R , COOR, где R - ацетил, CF_3CO , тозил;

(Б) где X представляет O;

R'_1 выбирают из группы, состоящей из N_3 , NO_2 , CF_3 , алкила C_1-C_{10} , алкил может быть замещен одной из групп NO_2 , N_3 , CF_3 , Br;

R'_1 , R'_3 , R'_4 и R'_5 все являются H;

(B) где X представляет собой O;

R'_3 выбран из группы, состоящей из CN, N_3 , замещенного алкила, где заместителем является CN, N_3 , NH_2 , R'_1 , R'_4 и R'_5 все являются H;

(II) где X представляет O;

один из радикалов R_3 и R_5 представляет межнуклеотидную связь, а другой выбран из группы, состоящей из OH, межнуклеотидной связи и гидроксиглобирующей группы, R' - обозначает H, а два радикала из R'_3 , R'_4 и R'_5 обозначают H, а третий модифицирован, как указано ниже:

(A) R'_3 выбран из группы, состоящей из замещенного алкила C_1-C_{10} , аралкила C_1-C_{10} , арила; замещенного арила, а заместитель у алкила C_1-C_{10} иной, чем OH;

(Б) R'_4 выбран из группы, состоящей из замещенного алкила C_1-C_{10} , аралкила C_1-C_{10} , арила, замещенного арила, радикала с высокой электроотрицательностью, CF_3 или NO_2 и заместитель у алкила C_1-C_{10} и арила иной, чем OH, NH_2 ;

(B) когда R_5 обозначает межнуклеотидную связь, R'_5 выбран из группы, состоящей из замещенного алкила C_1-C_{10} , аралкила C_1-C_{10} , арила, замещенного арила и заместитель у алкила C_1-C_{10} иной, чем NH_2 .

2. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что оно соответствует группе I(A).

3. Соединение по п. 2, отличающееся тем, что R'_3 выбран из группы, состоящей из алкила C_1-C_{10} , замещенного алкила C_1-C_{10} , аралкила C_1-C_{10} , арила, замещенного арила, а R'_1 , R'_4 и R'_5 все являются H.

4. Соединение по п. 2, отличающееся тем, что R'_5 выбран из группы, состоящей из алкила, C_1-C_{10} , замещенного алкила C_1-C_{10} , аралкила C_1-C_{10} , арила, замещенного арила, а R'_1 , R'_3 и R'_4 все являются H.

5. Олигонуклеотид, содержащий нуклеозид по п. 2.

6. Олигонуклеотид, содержащий нуклеозид по п. 3.

7. Олигонуклеотид, содержащий нуклеозид по п. 4.

8. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что оно соответствует группе I(Б).

9. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что оно соответствует группе (B).

10. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что оно соответствует группе II(A).

11. Соединение по п. 10, отличающееся тем, что заместитель по меньшей мере одного замещенного алкила выбран из группы, содержащей NH_2

12. Соединение по п. 10, отличающееся тем, что заместитель по меньшей мере одного замещенного алкила, замещенного арила выбран из группы, состоящей из CN, N_3 , галогена.

13. Соединение по п. 10, отличающееся тем, что заместитель по меньшей мере одного замещенного алкила, замещенного арила выбран из группы, состоящей из COOR', CONR'R'', где R' и R'' - низший алкил.

14. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что оно соответствует группе II(Б).

15. Олигонуклеотид по п. 14, отличающийся тем, что заместитель по меньшей мере одного замещенного алкила выбран из группы, состоящей из NHR', NR'R''R''', где R', R'', R''' независимо выбраны из группы, состоящей из низшего алкила и низшего алкилкарбонила.

16. Олигонуклеотид по п. 14, отличающийся тем, что заместитель по меньшей мере одного замещенного алкила, замещенного арила выбран из группы, состоящей из CN, NO_2 , галогена.

17. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что оно соответствует группе II(B).

18. Олигонуклеотид по п. 17, отличающийся тем, что заместитель по меньшей мере одного замещенного алкила, замещенного арила выбран из группы, состоящей из NHR' , где R' - низший алкил.

5 19. Олигонуклеотид по п. 17, отличающийся тем, что заместитель по меньшей мере одного замещенного алкила, замещенного арила выбран из группы, состоящей из CN , NO_2 , N_3 .

20. Олигонуклеотид по п. 17, отличающийся тем, что заместитель по меньшей мере одного замещенного алкила, замещенного арила выбирают из группы, состоящей из COOR' и $\text{CONR}'\text{R}''$, где R' и R'' - независимо низший алкил.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

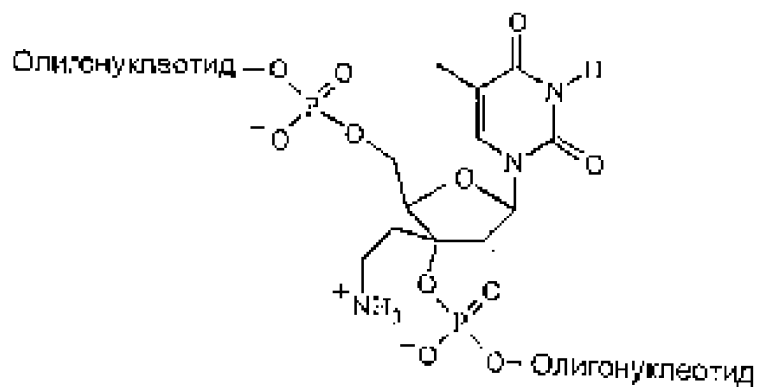
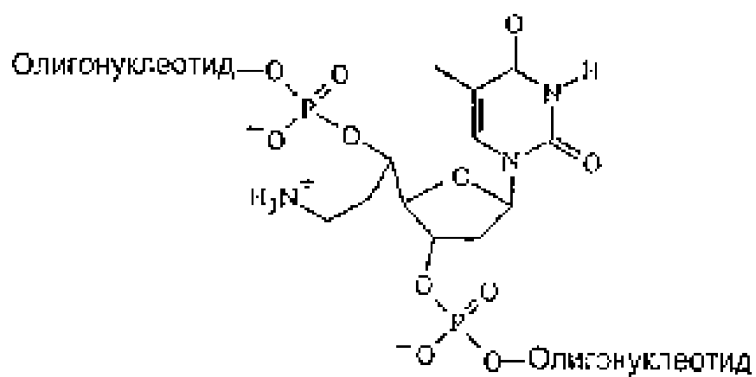
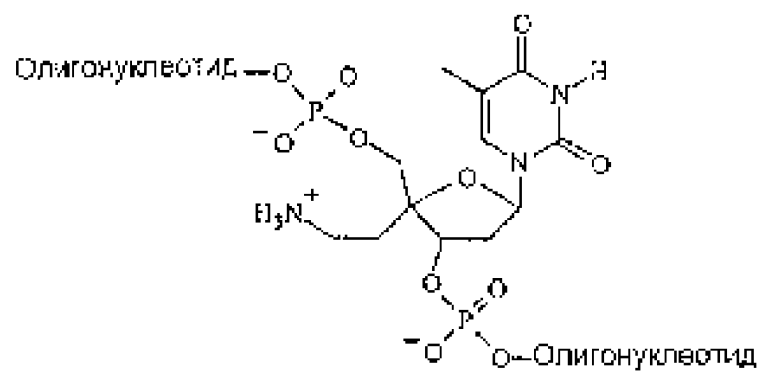
55

60

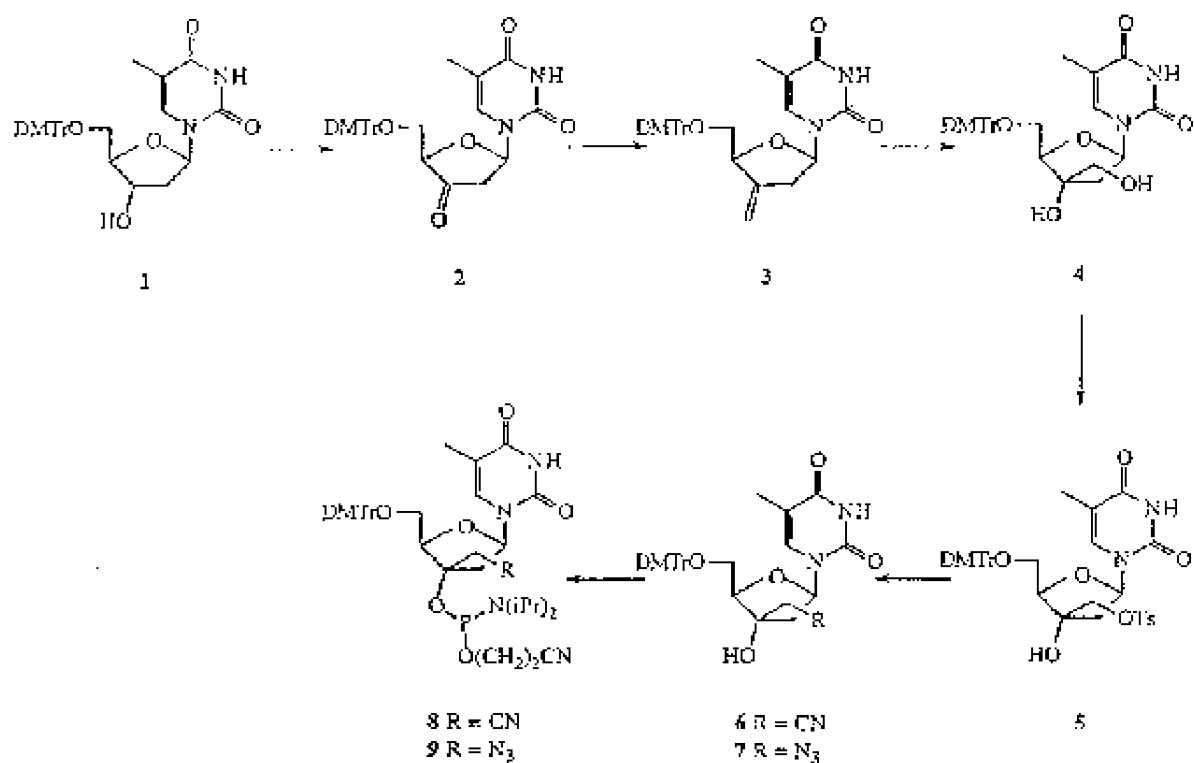
65

U A 4 5 3 6 2 C 2

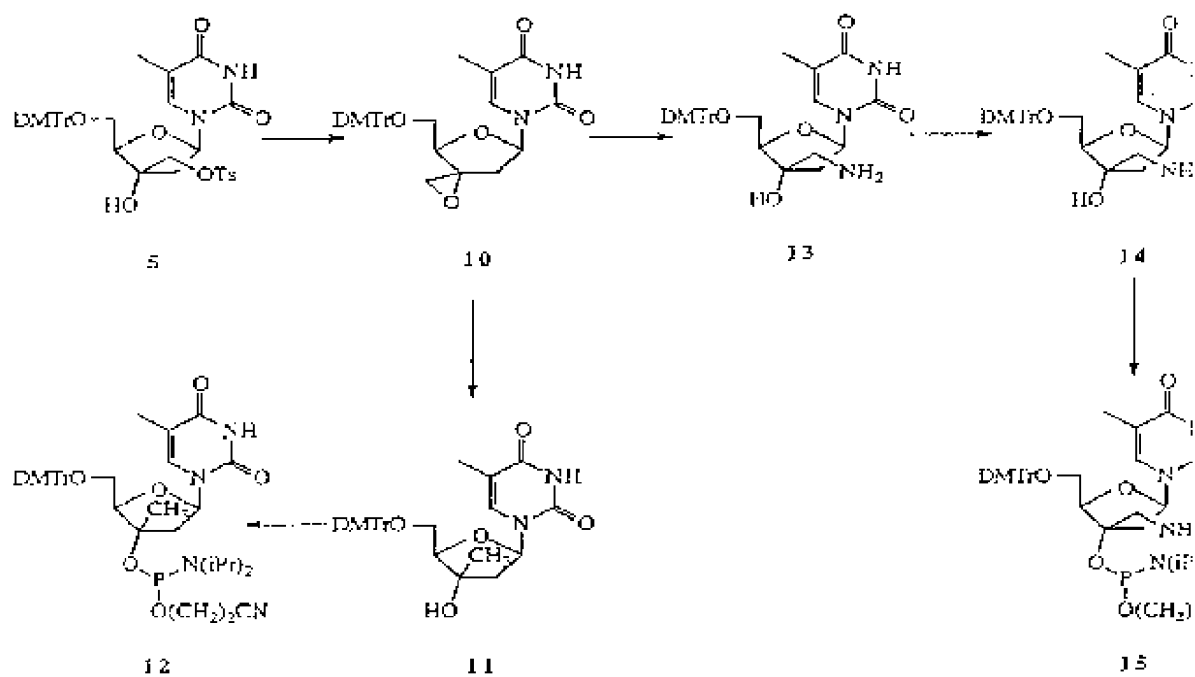
U A 4 5 3 6 2 C 2



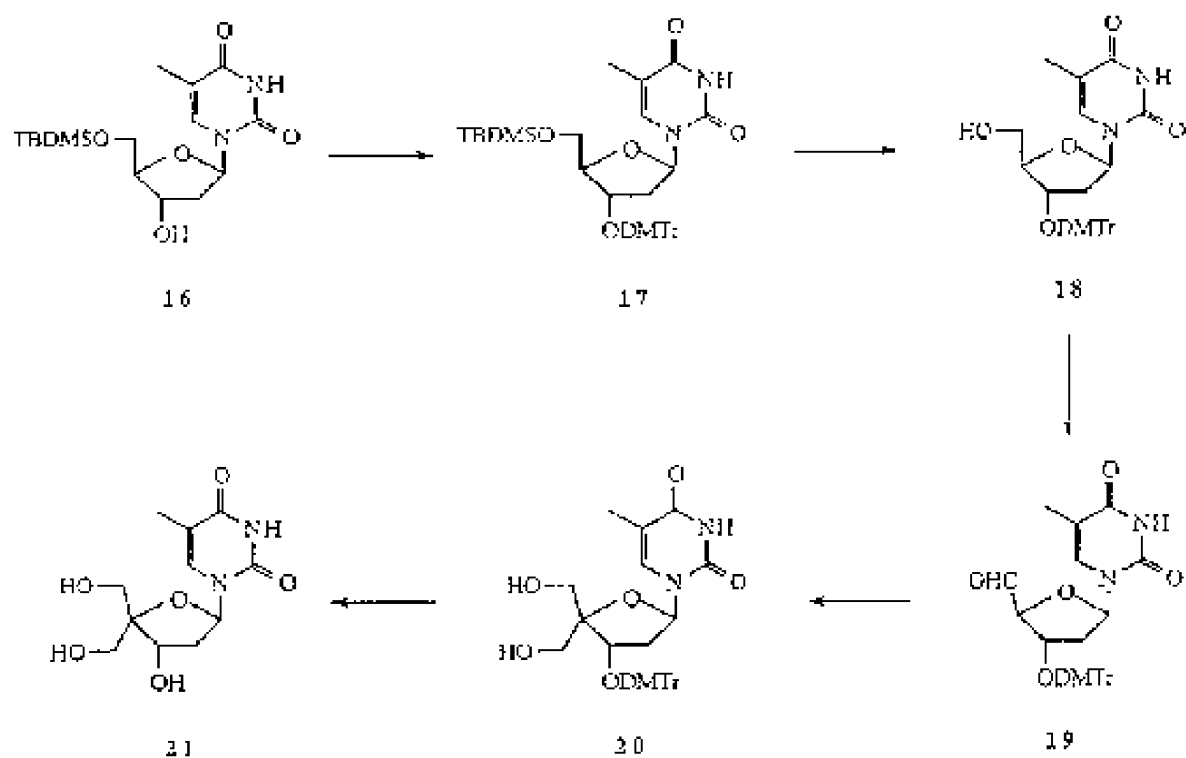
Фиг. 1



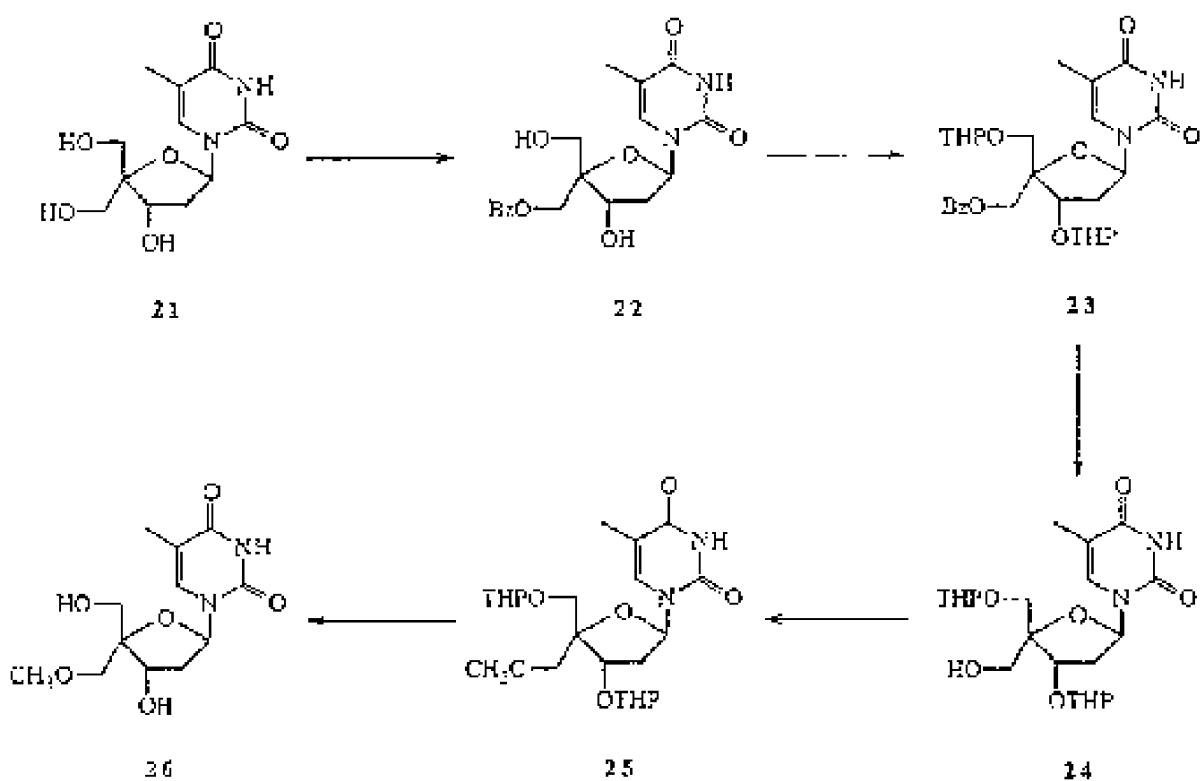
ФИГ. 2



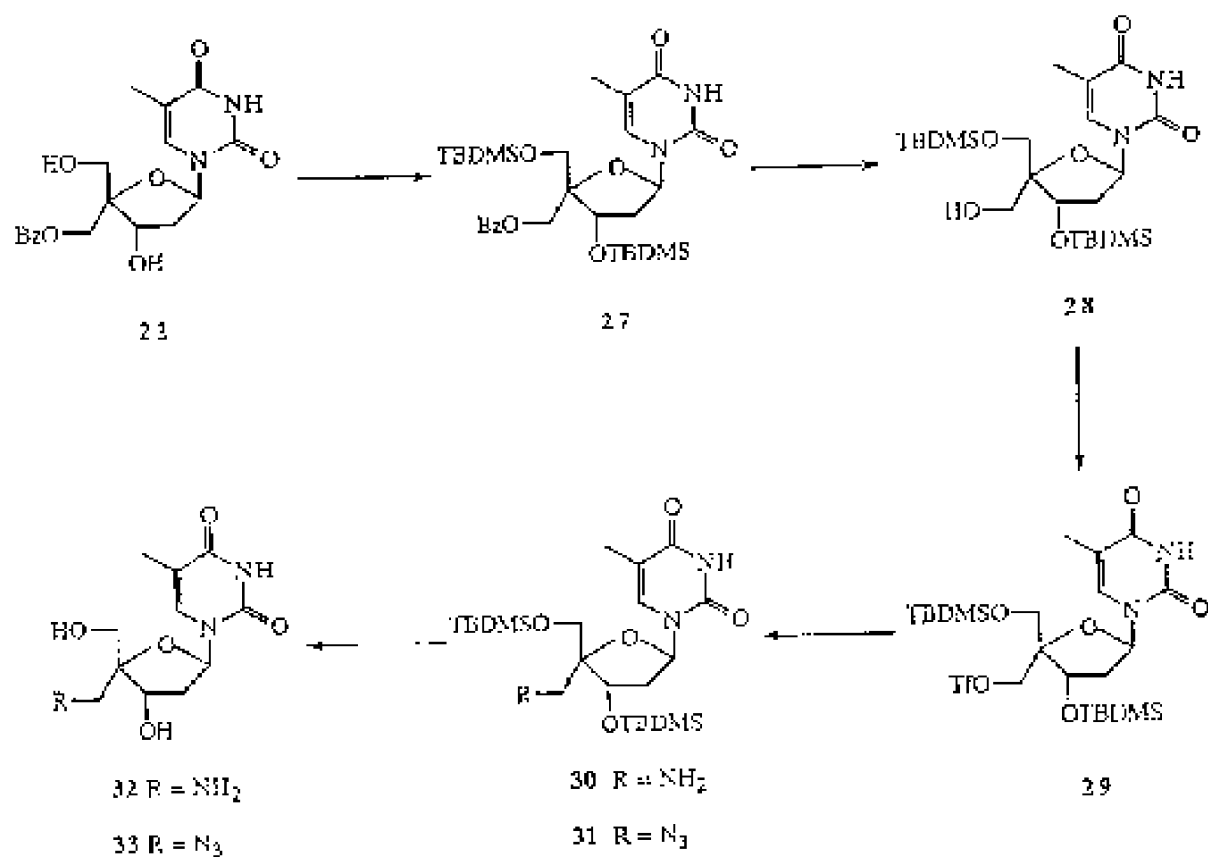
ФИГ. 3



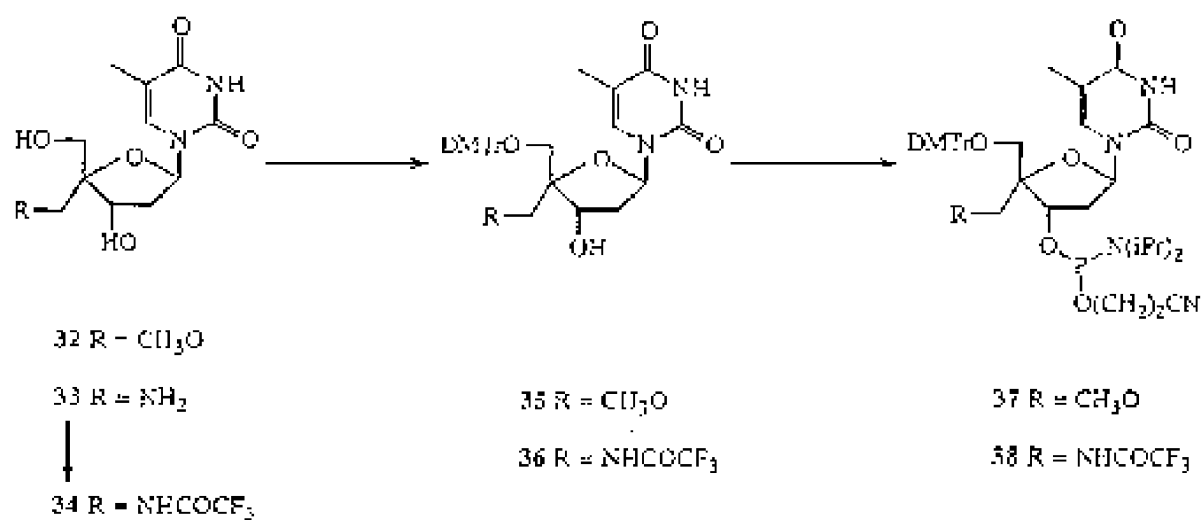
Фиг. 4



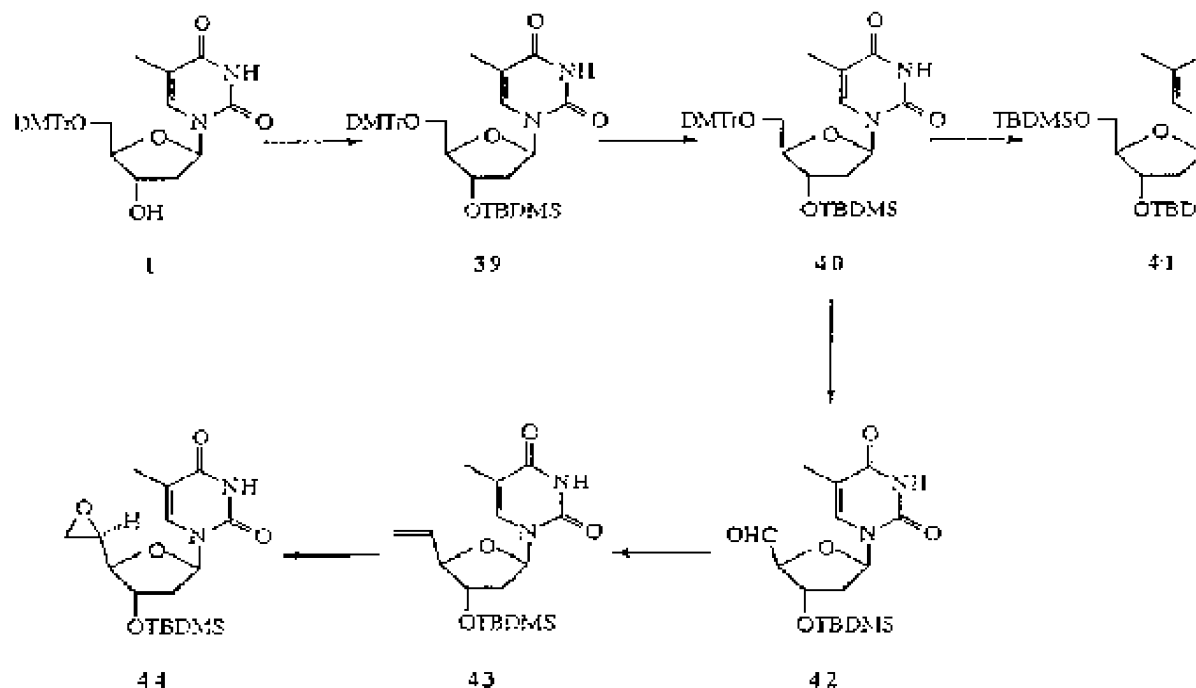
Фиг. 5



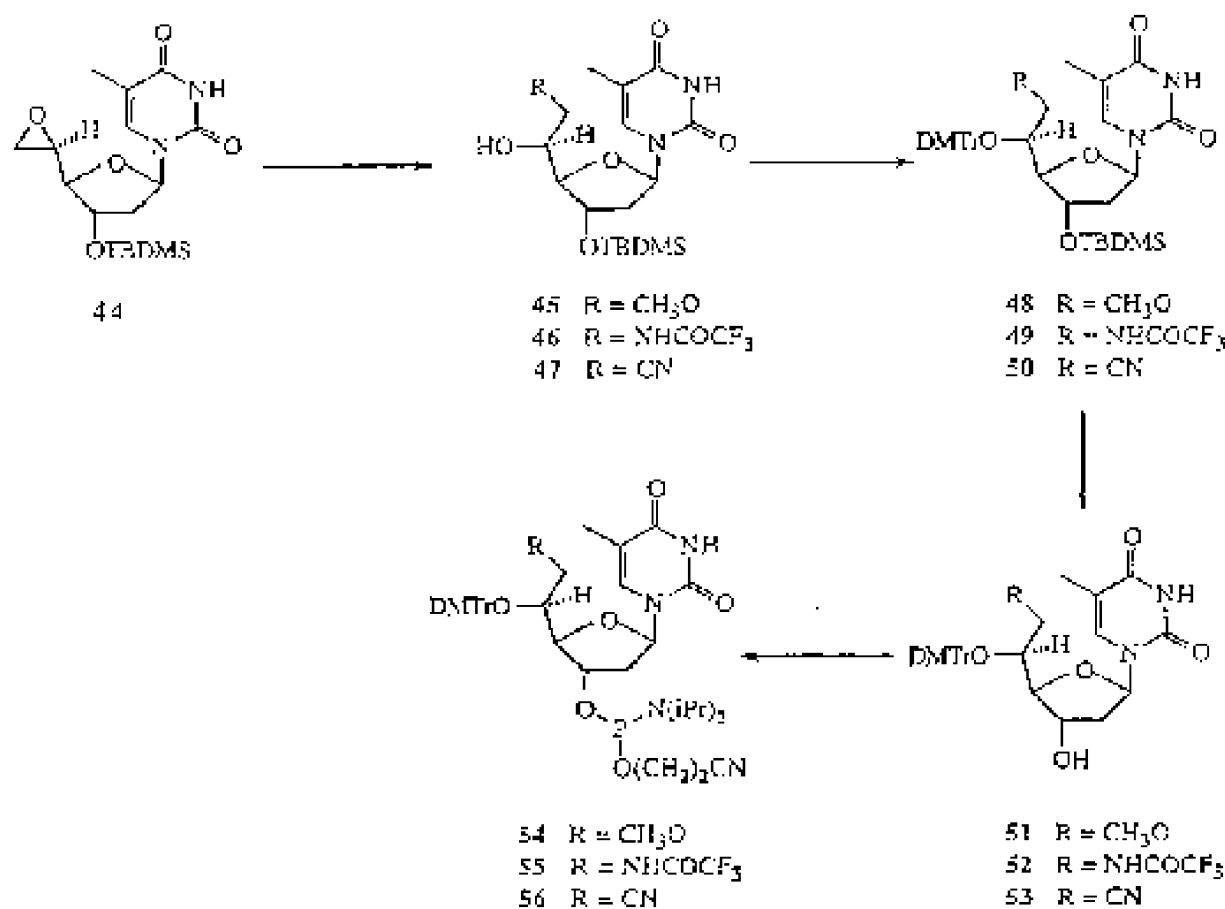
ФИГ. 6



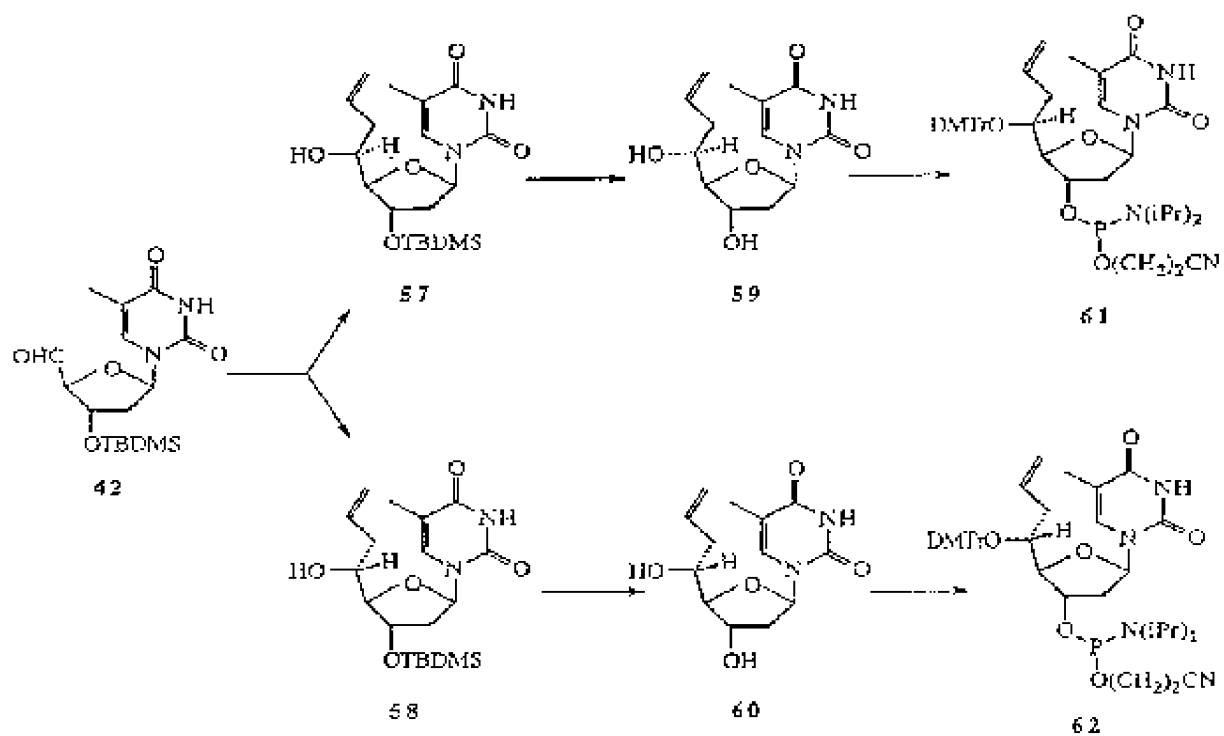
ФИГ. 7



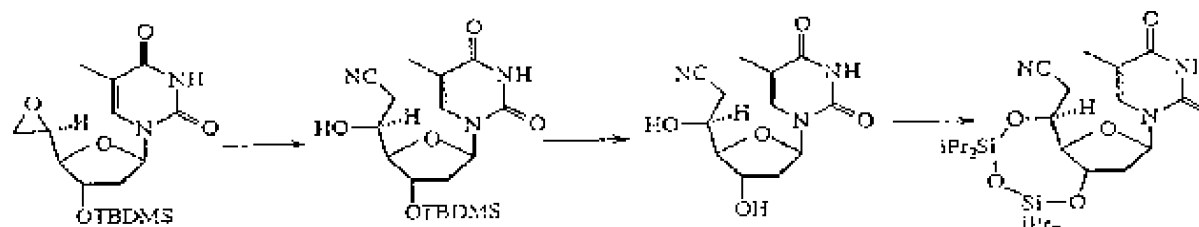
ФИГ. 8



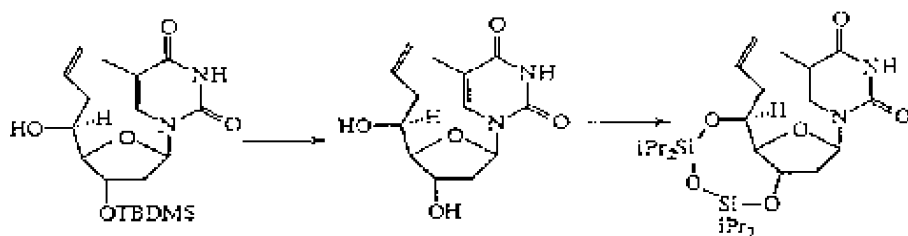
ФИГ. 9

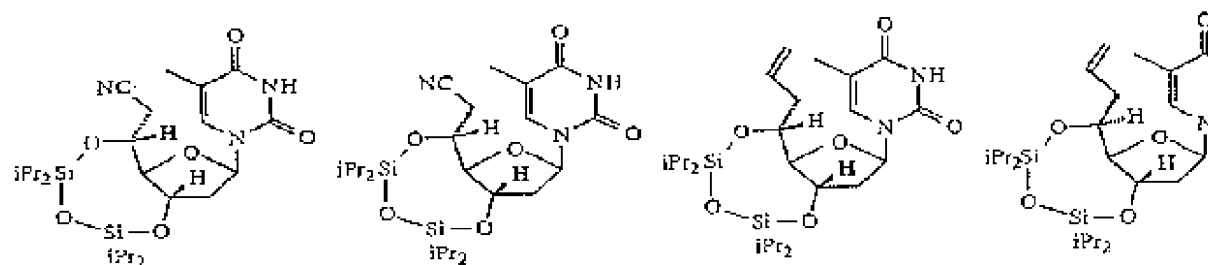


ФИГ. 10



ФИГ. 11





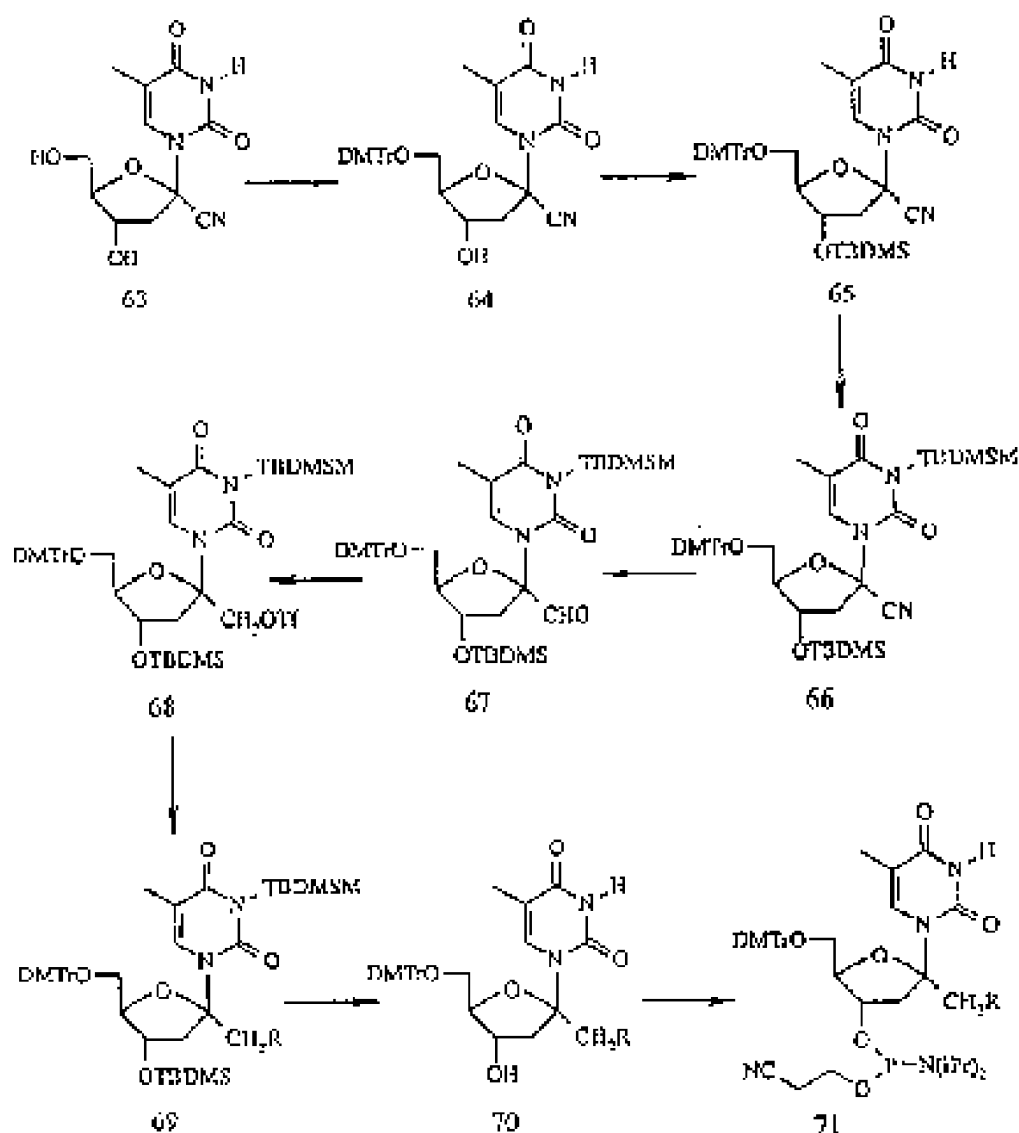
5'-(R)-изомер
5'-протоны насыщены,
увеличение NOE
для 3'-протонов: 6,6%

5'-(R)-изомер
3'-протоны насыщены,
увеличение NOE
для 5'-протонов: 6,3%

5'-(R)-изомер
3'-протоны насыщены,
увеличения NOE
для 5'-протонов: 4,8%

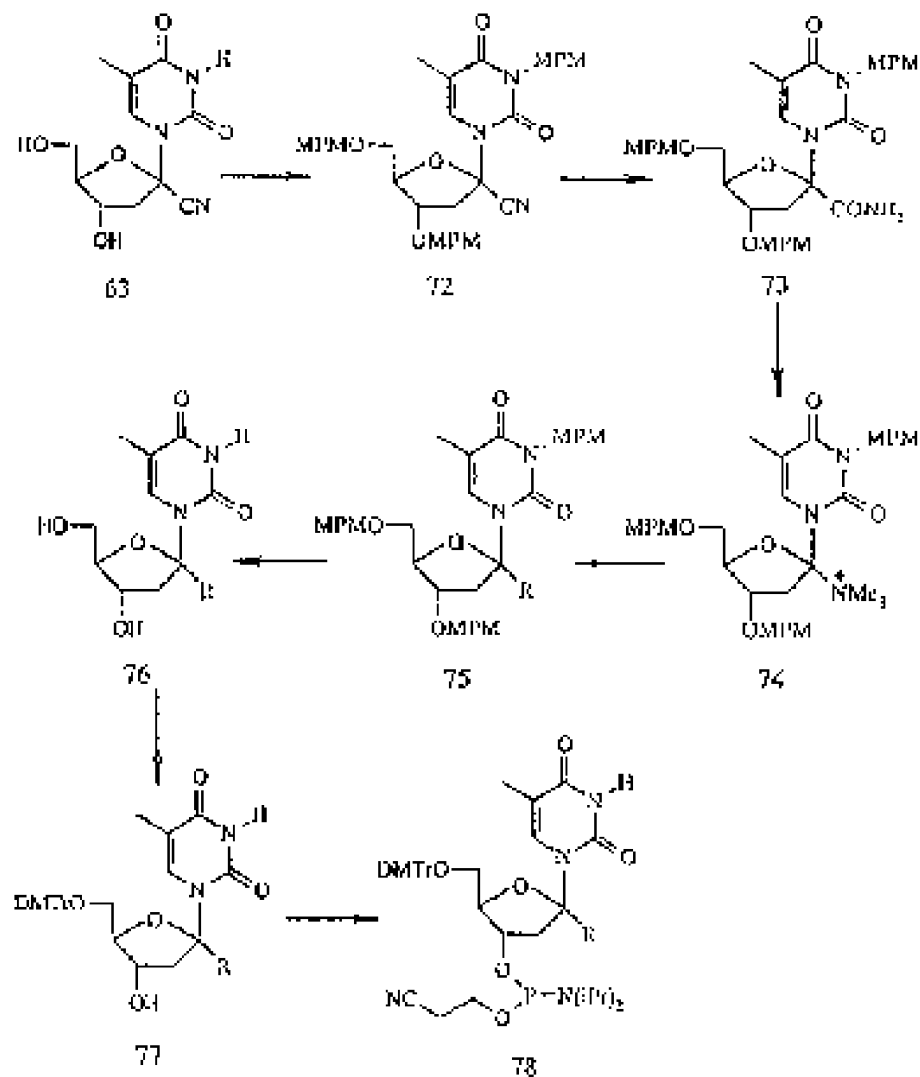
5'-(S)-изомер
3'-протоны насы
увеличения NOE
для 5'-протонов

Фиг. 12



TBDMSM = трет-бутилдиметилсилоксиметил

Фиг. 13



MPM = p-метоксибензил

Фиг. 14

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 4, 15.04.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.