



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 079 508** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК⁶ **C 07 H 23/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 93033478/04, 05.09.1991

(30) Приоритет: 12.09.1990 US 581502

(46) Дата публикации: 20.05.1997

(56) Ссылки: J.F.Cormier et. al. Nucleic Acids Research. 1988, v.16, N 10, p.4583 - 4594.
K.K. Ogilvie et. al. Tetrahedron Letters. 1985, v.26, N 35, p.4159 - 4162.

(86) Заявка PCT:
US 91/06290 (05.09.91)

(71) Заявитель:
Стерлинг Уинтроп Инк. (US)

(72) Изобретатель: Уэйс Александр Людвигович[IL],
Саха Ашиз Кьюмар[IN], Хаушир Фредерик Герман[US]

(73) Патентообладатель:
Стерлинг Уинтроп Инк. (US)

(54) СПОСОБ СОЕДИНЕНИЯ НУКЛЕОЗИДОВ 3'-5'-МЕЖНУКЛЕОТИДНЫМ СИЛИЛЬНЫМ ЗВЕНОМ

(57) Реферат:

Использование: в химии нуклеотидов или их аналогов. Сущность изобретения: способ соединения нуклеозидов 3'-5'-межнуклеотидным силильным звеном взаимодействием 3'-силилированного-5'-защищенного нуклеозида с незащищенным нуклеозидом в

растворителе в присутствии основного катализатора, создающего стерические помехи. Силилированные и незащищенные нуклеозиды могут быть либо мономерными нуклеозидами, либо концевыми нуклеозидами олигонуклеотидов или олигонуклеотидных аналогов. 14 з.п. ф-лы.

RU 2 0 7 9 5 0 8 C 1

RU 2 0 7 9 5 0 8 C 1



(19) **RU**⁽¹¹⁾ **2 079 508**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.⁶ **C 07 H 23/00**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 93033478/04, 05.09.1991

(30) Priority: 12.09.1990 US 581502

(46) Date of publication: 20.05.1997

(86) PCT application:
US 91/06290 (05.09.91)

(71) Applicant:
Sterling Uintrop Ink. (US)

(72) Inventor: Uehjs Aleksandr Ljudvik[IL],
Sakha Ashiz K'jumar[IN], Khaushir Frederik
German[US]

(73) Proprietor:
Sterling Uintrop Ink. (US)

(54) **METHOD OF NUCLEOSIDE LINKAGE BY 3'-5'-INTERNUCLEOTIDE SILYL UNIT**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry, nucleotides.
SUBSTANCE: method involves interaction of
3'-silylated-5'-protected nucleoside with
nonprotected nucleoside in solvent in the
presence of basic catalyst that makes steric

hindrances. Silylated and nonprotected
nucleosides can be either monomeric
nucleosides or terminal nucleosides of
oligonucleotides or oligonucleotide analogs.
EFFECT: improved method of linkage. 15 cl

RU 2 0 7 9 5 0 8 C 1

RU 2 0 7 9 5 0 8 C 1

Настоящее изобретение имеет отношение к методу соединения нуклеозидов силоксановым мостиком, включающему взаимодействие 3-силилированного нуклеозида с незамещенным нуклеозидом.

Кроме того, настоящее изобретение связано с методами синтеза олигонуклеотидных аналогов, имеющих, по крайней мере, один силоксановый межнуклеотидный мостик.

Нуклеиновые кислоты, РНК и ДНК, являются природными олигонуклеотидами. Употребляемый здесь термин "олигонуклеотид" означает гомополимерную или гетерополимерную последовательность нуклеозидов, в которых нуклеозиды соединены фосфодиэфирным мостиком.

Благодаря успехам технологии олигонуклеотиды, содержащие несколько сот нуклеозидов или оснований, теперь могут быть получены синтетическим путем. Синтез олигонуклеотидов: A Practical Approach, ed. by M.J. Gait, IRL Press, Washington, D.C (1984). Синтетические олигонуклеотиды имеют большое научное и терапевтическое применение. Синтетические олигодезоксинуклеотиды, например, широко используются в технологии рекомбинантных ДНК. [Gait, supra at 1. Недавно было показано, что синтетические олигонуклеотиды имеют терапевтическое значение в качестве антисмысловых агентов, ингибирующих экспрессию гена. [Uhlmann, E. and Peuman, A. Chemical Reviews, 90/4:544-583 /1990/.

Антисмысловый агент это соединение, которое связывается или гибридизируется с нуклеотидной последовательностью целевой нуклеиновой кислоты РНК или ДНК, чтобы ингибировать функцию указанной целевой нуклеиновой кислоты. Благодаря способности гибридизовываться как с РНК, так и с ДНК, антисмысловые агенты могут вмешиваться в экспрессию гена на уровне транскрипции, процессинга РНК или трансляции.

В настоящее время, однако, расширение практического научного и терапевтического применения антисмысловых технологий затрудняется рядом технических проблем. (См. например. Klausnem, A. Biotechnology 8:303-304, 1990; Armstrong, L. Business Week, March 5, 1990). Эти проблемы включают /1/ расщепление антисмысловых агентов эндогенными нуклеазами; /2/ высокую стоимость их производства; /3/ недостаточную специфическую гибридизацию с целевой нуклеиновой кислотой; /4/ стерическую тенденцию агентов, обуславливающую наличием хиральных фосфорных центров и /5/ малая эффективность транспорта всех агентов к желательным мишеням, объясняемая, например, неподходящими коэффициентами растворимости, мембранным транспортом и жизненным циклом клетки.

Один подход к приготовлению антисмысловых агентов, которые стабильны, устойчивы к действию нуклеаз, недороги в получении и которые могут быть доставлены к целевым нуклеиновым кислотам и гидридизованы с ними в организме, состоит в том, чтобы синтезировать олигонуклеотидные аналоги с модифицированными интернуклеотидными мостиками или звеньями [Uhlmann, E. Supra]

Используемое здесь понятие "олигонуклеотидный аналог" относится к

гомополимерным или гетерополимерным последовательностям нуклеозидов или их аналогов с иными, чем фосфодиэфирные, межнуклеотидными звеньями. Обычно рассматривают два типа олигонуклеотидных аналогов. Первый тип включает аналоги, имеющие модифицированные фосфатные звенья. Второй тип включает те аналоги, которые имеют нефосфатные межнуклеотидные звенья [Uhlmann E. Supra]

Представителями нефосфатных межнуклеотидных звеньев являются силоксан, карбамат, карбоксиметильные эфиры, ацетамидат, карбонат и тиозефиры.

Наиболее близкое к настоящему изобретению отношение имеет силоксановые мостики или связи.

Нуклеотидные димеры и гексамеры, имеющие силоксановые межнуклеотидные звенья, и метод синтеза таких полимеров описаны. (Ogilvie and Cormier, см. например, Ogilvie K.K. and Cormier, J.F. Tetrahedron Letters, 26(35):4159-4162 (1985); Cormier J.F. and Ogilvie K.K. Nucleic Acid Research, 16(10): 4583-4584 (1988)).

В соотношении с этим опубликованным методом 5'-защищенный нуклеозид подвергают взаимодействию с силилирующим агентом, с образованием 3'-силилированного нуклеозида; этот силилированный нуклеозид затем подвергают взаимодействию с защищенным нуклеозидом до образования полностью защищенного 3', 5'-силилсвязанного динуклеозида. С полностью защищенного силилсвязанного динуклеозида с обоих концов снижают защиту, чтобы привести удлинение цепи еще через один цикл сочетания с защищенными нуклеозидами.

При осуществлении этого метода возникают определенные проблемы. Когда этот метод используется для синтеза нуклеотидных полимеров, желаемый конечный продукт получается с низкими выходами, в пределах от 35 до 46% Низший выход обеспечен как образованием нежелательных побочных продуктов, в частности 3', 3'-симметрично димера [Uhlmann, E. Supra at pg. 553] что является результатом самоконъюгации нуклеотидных "строительных блоков", так и значительно потерей полевого продукта в процессе снятия защиты с полимера.

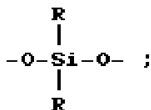
Настоящее изобретение предусматривает способ соединения нуклеозидов силоксановым мостиком, препятствующий образованию 3',3'-димера. Этот метод включает взаимодействие силилированного нуклеозида с незащищенным нуклеозидом в присутствии катализатора основного характера, создающего помехи. Применение незащищенных нуклеозидов, по сравнению с методом Ogilvie and Cormier, имеет преимущества, выражающиеся как в увеличении выхода желаемого конечного продукта, так и в эффективности синтеза /снижая, таким образом, стоимость/.

Преимущественный вклад данного изобретения, согласно которому реакция протекает в присутствии катализатора основного характера, создающего стерические помехи, состоит в том, что обеспечивается то преимущество, что образование нежелательных 3',3'-симметричных димеров сжигено до

минимума.

Данное изобретение, обеспечивающее соединение нуклеозидов силоксановым мостиком, включает взаимодействие 3'-силилированного-5'-защищенного нуклеозида с незащищенным нуклеозидом в присутствии катализатора основного характера, создающего помехи.

Силоксановый мостик имеет формулу:



где каждый R независимо друг от друга алкил C₁ C₆. Предпочтительно, чтобы R был метильной или изопропильной группой.

Как силилированный нуклеозид, так и незащищенный нуклеозид могут быть либо мономерными нуклеозидами, либо 5' и 3' концевыми нуклеозидами соответственно олигонуклеотидов или аналогов олигонуклеотидов. Предпочтительные мономерные нуклеозиды тимидин, N⁶-бензоилдезоксиаденозин, N⁴-бензоилдезоксицитидин и N²-изобутилдезоксигуанозин.

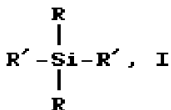
Взаимодействие 3'-силилированного-5'-защищенного нуклеозида с незащищенным нуклеозидом предпочтительно протекает в нейтральном или щелочном апротонном растворе. В лучшем варианте щелочной апротонный раствор содержит 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридин в смеси ацетонитрила и диметилформамида.

С другой стороны, настоящее изобретение включает метод синтеза олигонуклеотидного аналога, имеющего силоксановые межнуклеозидные звенья, состоящий из следующих стадий:

а/ силилирование 5'-защищенного нуклеозида бифункциональным силилирующим реагентом до образования 3'-силилированного-5'-защищенного нуклеозида;

б/ взаимодействие силилированного нуклеозида с незащищенным нуклеозидом; и в/ повторение стадий а/ и б/ до образования указанного олигонуклеотидного аналога.

Бифункциональные силилирующие реагенты, применяемые в данном изобретении, имеют формулу I:



где каждый R независимо друг от друга алкил C₁ C₆; R¹ удаляемая группа. В предпочтительном варианте, силилирующий агент симметричен, R изопропильная или метильная группа, а R¹ такая удаляемая группа, как Cl или SO₂CF₃.

Как 5'-защищенный нуклеозид, так и незащищенный нуклеозид могут независимо быть тимидоном, N⁶-бензоилдезоксиаденозином, N⁴-бензоилдезоксицитидином или N²-изобутилдезоксигуанозином.

Лучше, если обе стадии а/ и б/ протекают в щелочном апротонном растворе и еще лучше в растворе, содержащем 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридин в смеси

ацетонитрила и диметилформамида; так более предпочтительна смесь указанных растворителей с объемным соотношением около 1:1.

Настоящее изобретение далее охватывает твердофазный метод синтеза олигонуклеотидных аналогов, имеющих силоксановые межнуклеозидные связи, включающий следующие стадии:

а/ фиксация 5'-защищенного нуклеозида на твердом носителе;

б/ снятие защиты с иммобилизованного нуклеозида;

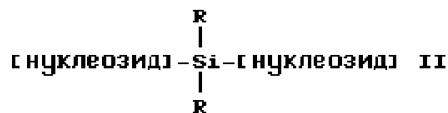
в/ взаимодействие незащищенного нуклеозида с 3'-силилированным 5'-защищенным нуклеозидом в присутствии катализатора основного характера и нейтрального или основного апротонного растворителя;

г/ блокирование непрореагировавших нуклеозидов;

д/ повторные стадии б/, в/ и г/ до образования олигонуклеотидного аналога нужной длины;

е/ отделение образовавшегося олигонуклеотидного аналога от твердого носителя.

Силоксановые межнуклеотидные звенья олигонуклеотидного аналога имеют формулу II.



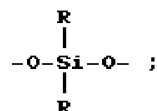
где каждый R независимо друг от друга алкил C₁ C₆.

В твердофазном методе катализатор основного характера, применяемый в соответствии в настоящем изобретении, является, преимущественно создающим помехи основанием, предпочтительно 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридином.

Обычно, основание, а именно имидазол, также присутствует в качестве стабилизатора силилированного промежуточного продукта. Его присутствие также помогает улучшить выход. Предпочтительный апротонный растворитель смесь ацетонитрила и диметилформамида, наиболее предпочтительно в объемном соотношении около 1:1. Образовавшийся олигонуклеотидный аналог предпочтительнее отделить от твердого носителя с помощью раствора водного аммиака в изопропанол и ацетонитриле.

Нуклеозиды, связанные силоксановым мостиком, синтезируются путем взаимодействия 3'-силилированного-5'-защищенного нуклеозида с незащищенным нуклеозидом.

Силоксановые мостики, рассматриваемые настоящим изобретением, являются диалкилсилильными звеньями с формулой:



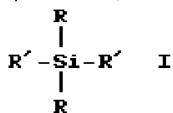
где каждый R R независимо друг от друга алкил C₁ C₆.

В предпочтительном варианте, R изопропильная или метильная группа.

3'-силилированный-5'-защищенный нуклеозид может быть приготовлен способом, известным и легко доступным специалисту в

данной области. В предпочтительном варианте 3'-гидрокси-5'-защищенный нуклеозид подвергают взаимодействию с бифункциональным силилирующим реагентом в щелочном апротонном растворе. Защитную группу для гидроксильной группы у 5'-углеродного атома выбирают, исходя из ее кислотоустойчивости. Проходящие и легко доступные защитные группы известны для специалистов по синтезу олигонуклеотидов. Лучшими защитными группами являются тритильные, особенно монометокситритил и диметокситритил. Наиболее предпочтительной группой является диметокситритил /DMT/.

Бифункциональные силилирующие реагенты, рассматриваемые настоящим изобретением, имеют формулу:



где каждый R независимо друг от друга алкил C₁-C₆, а R¹ удаляемая группа. В предпочтительном варианте силилирующий реагент является симметричным; R изопропил или метил, R¹ Cl или SO₂CF₃.

Щелочной апротонный раствор преимущественно содержит акцептор протонов, такой как основание, растворенное в апротонном растворителе. Подходящие основания и растворители известны и легко доступны специалистам. Предпочтительным основанием является создающее помехи основание типа

2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридин.

Предпочтительный растворитель смесь диметилформамида /DMF/ и ацетонитрила /CH₃CN/.

Нуклеозиды, используемые в данном изобретении, включают как в окси-, так и в дезоксинуклеотиды. Пуриновые и пиримидиновые части таких нуклеозидов при желании могут быть защищенными по экзоциклическим аминогруппам.

Предпочтительной защитной группой для таких экзоциклических аминогрупп аденина и цитозина является бензоильная группа.

Предпочтительной защитной группой для экзоциклической аминогруппы гуанина является изобутильная группа. При желании гуанин можно также защитить по O⁶ положению.

3'-Силилированный нуклеозид, используемый в данном изобретении, может быть нуклеозидным мономером или 3'-концевым нуклеозидом олигонуклеотида или олигонуклеотидного аналога. 3',5'-Незащищенный нуклеозид, используемый в данном изобретении, может быть нуклеозидным мономером или 5'-концевым нуклеозидом олигонуклеотида или олигонуклеотидного аналога, в котором как 3'-, так и 5'-концевые нуклеозиды не защищены. Олигонуклеотидный аналог может иметь любой тип межнуклеозидной связи.

В равной мере способ данного изобретения может быть применен и для синтеза олигонуклеотидных аналогов, имеющих только силоксановые межнуклеотидные звенья. Синтез таких олигонуклеотидных аналогов осуществляют в соответствии с модифицированным методом синтеза в жидкой или твердой фазе [Gait,

Supra]

В предпочтительном варианте метода синтеза в растворе за реакцией мономерного 3'-силилированного-5'-защищенного нуклеозид с первым мономерным незащищенным нуклеозидом следует реакция 5'-защищенного силсилсвязанного /3' 5'/ динуклеозидного продукта /нуклеозидного диаметра/ с бифункциональным силилирующим реагентом и вторым незащищенным мономерным нуклеозидом, приводящая к образованию 5'-защищенного силсилсвязанного тримера /тринуклеотида/. Длина цепи увеличивается путем повторения этих стадий реакции до тех пор, пока олигонуклеотидный аналог /нуклеозидный полимер/ не достигает желаемой длины.

Допустимо и предпочтительно осуществлять удлинение цепи или проводить элонгацию путем выделения 5'-защищенных силсилсвязанных полимеров после их образования, удаления 5'-защитной группы и использования таких незащищенных нуклеозидных полимеров вместо незащищенных мономерных нуклеозидов. В этом случае элонгация цепи протекает быстрее и более эффективно стехиометрически /т.е. тримердимер, тример + тример/.

В предпочтительном варианте олигонуклеотидные аналоги, имеющие силоксановые межнуклеотидные звенья, синтезируются модифицированным твердофазным способом, использующим метод нуклеотидного связывания, предлагаемый данным изобретением.

Начальная стадия твердофазного синтеза присоединение 5'-защищенного нуклеотида к твердому носителю, лучше к носителю на основе стекла с порами определенных размеров (СПС), нуклеотид лучше присоединять к ПС носителю через сукцинатную связь по 3'-положению гидроксила нуклеотида. Другие способы присоединения нуклеотидов к твердым носителям известны и вполне доступны специалистам в области синтеза олигонуклеотидов. Кроме того, такие 5'-защищенные нуклеозиды, связанные с ПС-носителем, коммерчески доступны.

После присоединения первого нуклеотида к твердому носителю элонгация цепи проходит через последовательные стадии удаления 5'-гидроксилзащитяющей группы у иммобилизованного нуклеотида, добавления 5'-защищенного-3'-силилированного нуклеотида вместе с активирующим реагентом и блокирование непрореагировавших цепей.

Защищенная группа при 5'-положении гидроксила иммобилизованного нуклеотида удаляется кислотой, предпочтительно трихлоруксусной кислотой.

Стадия активация протекает в присутствии добавленного силилированного нуклеотида и затрудненного основного активирующего реагента. Предпочтительный активирующий реагент создающее помехи основание, такое как 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридин.

Предпочтительный растворитель это смесь ацетонитрила и диметилформамида. Непрореагировавшие цепи отщепляют или блокируют блокирующими реагентами, такими как уксусный ангидрид и N-метилимидазол.

После того, как получена

олигонуклеотидная цепь нужной длины, ее отделяют от твердого носителя и защитные группы удаляют традиционными методами [Gaits, Supra, at p-p 67-70]

Предпочтительно завершённые цепи отщеплять от твердого носителя раствором водного аммиака в изопропанол и ацетонитриле.

Используя описанные выше твердофазные синтетические методы, были получены 3',5'-силлил-связанные нуклеозидные полимеры или олигонуклеотидные аналоги, имеющие силоксановые межнуклеозидные звенья любой желаемой длины.

Специалисты в данной области могут учесть, что другие пути синтеза олигонуклеотидов могут быть модифицированы аналогичным образом, чтобы получить олигонуклеотидные аналоги, содержащие силоксановые межнуклеотидные звенья. Специалисты могут также учесть, что методы данного изобретения могут быть использованы в сочетании с известными приемами получения олигонуклеотидов или их аналогов, имеющих другие типы межнуклеозидных связей, чтобы получить олигонуклеотидные аналоги, содержащие одновременно силоксановые и любые другие связи.

Подходящими основаниями являются аденин /A/, цитидин /C/, гуанин /G/, урацил /U/, тимин /T/ и их производные, например 5-бром- или 5-иодурацил, 5-метилцитозин, изоцитозин /2-амино-4-оксопиримидин/ изогуанин /2-оксо-6-аминопурин/, инозин /6-оксопурин/, 5-винилурацили 5-виллицитозин.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение, но не ограничивают его.

При описании ЯМР-спектров использовали следующие обозначения: S-синглет, d-дублет, t-триплет, g-квартет, m-мультиплет.

Пример 1. Синтез 5'-О-диметокситритил-3'-О-5'-диметилсиллил-3'-О-ацетилтимидил/тимидина

Раствор 5'-О-диметокситритилтимидина /7,35 ммоль, 4,0 г/ в CH_2Cl_2 /40 мл/ и триэтиламино /16,16 ммоль, 2,2 мл/ медленно вводят в раствор дихлордиметилсилана /7,35 ммоль, 0,948 г, 0,89 мл/ в CH_2Cl_2 /10 мл/ при $-40^\circ C$ /сухой лед CH_3CN / и перемешивают при $-40^\circ C$ в течение 3 ч. Добавляют раствор 3'-О-ацетилтимидина /3,5 ммоль, 1,0 г/ и триэтиламино /16,16 ммоль, 2,2 мл/ в CH_2Cl_2 /25 мл/ и реакционную смесь перемешивают при $0^\circ C$ в течение 3 ч. Реакцию останавливают добавлением 5% водного раствора $NaHCO_3$ /25 мл/. Органический слой промывают соевым раствором /2 x 25 мл/ и высушивают над Na_2SO_4 . Сырой продукт /5,3 г/ очищают колоночной хроматографией / SiO_2 , градиент этилацетата/гексана/.

Полученный выход: 670 мг, 22% Rf 0,23 /7:3 этилацетат:гексан/

1H -ЯМР /300 МГц, $CDCl_3$ / δ 9,02 / S, 1H, NH/, 8,95/S, 1H, NH/, 7,64/S, 1H/, 7,50/S, 1H/, 7,41 7,27 /m, 9H/, 6,84/d, J=7,8 Гц, 4H/, 6,38/m, 2H/, 5,19/d, J= 5,6 Гц, 1H/, 4,61/d, J=2,5 Гц, 1H/, 4,04/S, 2H/, 3,87/S, 2H/, 3,79/S, 6H/, 3,39/ABg, J= 10,4 Гц, ΔV = 67,3 Гц, 2H/, 2,41 2,26/m, 4H/, 2,09/S, 3H/, 1,89/S, 3H/, 1,50/S, 3H/, 0,16/S, 3H/;

0,15/S, 3H/. FABMS/TG/G, 5% $HOAc$: /M+H/ $^+$ =884,6.

Пример 2.

Синтез 5'-О-диметокситритил-3'-О-5'-О-диизопропилсиллилтимидил/тимидина.

Метод А. Катализатор основного характера, создающий помехи. Раствор 5'-О-диметокситритилтимидина /0,92 ммоль, 0,5 г/ и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридина /0,23 ммоль, 47 мг/ в диметилформамиде /4 мл/ добавляют к раствору 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридина /1,0 ммоль, 0,2 г/ и диизопропилсиллилбистрифлата /1,0 ммоль, 0,30 мл/ в CH_3CN /5 мл/ при $-40^\circ C$. После 30 мин при $-40^\circ C$ реакционную систему доводят до комнатной температуры. Добавляют имидазол /1,0 ммоль, 70 мг/, затем добавляют незащищенный тимидин /0,8 ммоль, 193 мг/. Реакционную смесь перемешивают в течение 1 ч и затем добавляют по каплям к интенсивно перемешиваемой смеси льда с водой /500 мл/. Полученную смесь затем перемешивают в течение 30 мин и фильтруют. Сырой продукт очищают хроматографически и методом.

Полученный выход 70% Rf 0,45 /5% MeOH/ EtOAc/.

1H -NMR /300 МГц, $CDCl_3$ / δ 9,85/S, 1H, NH/, 9,44/S, 1H, NH/, 7,64/S, 1H/, 7,41 7,24/m, 10H/, 6,84/d, J= 7,8 Гц, 4H/, 6,33/m, 2H/, 4,65/S, 1H/, 4, 4,43/, J=2,2 Гц, 1H/, 4,11/d, J=2,56, 1H/, 4,00/d, J=3,36, 1H/, 3,93/ABg, J= 3,7 Гц, 11 Гц, ΔV = 24,6, 2H/; 3,79 (S, 6H/; 3,39 (ABg, J=3,0 Гц, 10,8 Гц ΔV = 49,5 Гц, 2H/; 2,50 2,38/m, 2H/, 2,30 2,07/m, 2H/; 1,88/S, 3H/; 1,56/S, 3H/; 1,05 0,98/m, 14H/.

^{13}C -NMR / $CDCl_3$ / δ 164,84; 164,80; 159,40; 151,72; 151,25; 144,89; 136,16; 136,01; 135,86; 130,60; 128,58; 127,75; 113,80; 112,10; 111,42 87,48; 87,38; 85,76; 85,48; 73,90; 71,70; 63,82; 63,48; 60,75; 55,57; 41,71; 40,85; 21,24; 17,52; 17,47; 17,39; 14,35; 12,69; 12,18; 12,10; 11,85; FABMS /TG/G/: /M+H/ $^+$ =899.

Анал. расчит. для $C_{47}H_{58}N_4O_{12}$, C 62,79; H 6,50; N 6,23; мол. вес. 898. Найдено, C 61,83; H 6,53; N 6,23.

Метод Б. Катализатор основного характера, не создающий помех.

Раствор 5'-О-диметокситритилтимидина /6,65 ммоль, 3,54 г/ и имидазола /13,3 ммоль, 0,88 г/ в ДМФА /18 мл/ медленно добавляют через капельную воронку в раствор дихлордиизопропилсилана /6,62 ммоль, 1,22 г, 1,20 мл/ в ДМФА /4,5 мл/ при $-40^\circ C$ /сухой лед CH_3CN . Реакционную смесь перемешивают при $-40^\circ C$ в течение 1 ч, затем доводят до комнатной температуры в течение ночи. Затем реакционную смесь по каплям вносят 30 мин. Смесь фильтруют и получают продукт в виде белого осадка, которые высушивают на воздухе и подвергают колоночной хроматографии / SiO_2 , градиент от 60% до 100% EtOAc /гексан/. Выход: 1,74 г, 25%

Пример 3. Синтез N⁶-бензоил-2'-дезоксигуанидин-5'-О-диметокситритил-3'-О-5'-диизопропилсиллилтимидил/аденозина.

N⁶-бензоил-2'-дезоксигуанидин-5'-О-диметокситритиладенозин /5 ммоль, 3,28 г/ и имидазол /10 ммоль, 0,68 г/ растворяют в

-6-

ДМФА /15 мл/ и медленно добавляют раствор через капельную воронку в раствор дихлордиизопропилсилана /5 ммоль, 0,9 мл/ в ДМФА /1,5 мл/ при -40°C /сухой лед CH₃CN/. Реакционную систему перемешивают при -40 °C в течение 1 ч и добавляют растворы тимидина /7,5 ммоль, 1,81 г/ и имидазола /7,5 ммоль, 0,51 г/ в ДМФА /20 мл/ через капельную воронку. Реакционную смесь перемешивают при -40°C в течение 1 ч и затем доводят до комнатной температуры в течение ночи. Реакционную смесь затем вносят по каплям в тщательно перемешиваемую смесь льда с водой /1 л/ и перемешивают 30 мин. Осадок отфильтровывают и высушивают, получая белый осадок /5,8 г/, который очищают методом препаративной ТСХ /1 мм SiO₂, 3% MeOH /EtOAc/.

Полученный выход: 50 мг, 38. Rf 0,32 /2% MeOH /EtOAc/.

¹H-NMR /300 МГц, CDCl₃ /9,99/s, 1H, NH/; 8,76/s, 1H/; 8,22/s, 1H/; 8,09/d, J=7,8, 2H/; 7,55 7,13/m, 13H/; 6,74/m, 4H/; 6,42/t, J=5,8 Гц, 1H/; 6,25/t, g= 6,0, 1H/; 4,96/d, J=5,4 Гц, 1H/; 4,48/s, 1H/; 4,19/d, J=3,8 Гц, 1H/; 3,94/s, 1H/; 3,83 3,72/m, 6H/; 3,38/d, J=3,4 Гц, 2H/; 2,83 - 2,76/m, 1H/; 2,60 6,52 /m, 1H/; 2,45 2,38/m, 1H/; 2,05 1,95/m, 1H/; 1,79/s, 3H/; 0,95/m, 14H/. FABMS /TG/G/ :M+H⁺=1011.

Пример 4. Синтез N⁴-бензоил-2'-дезоксиди-5'-О-диметокситритил-3'-О- /5'-диизопропилсилитимидил/цитидина.

Процесс, описанный в примере 3, был использован для синтеза вышеназванного соединителя. Очистку целевого продукта осуществляют методом препаративной ТСХ /1 мм SiO₂, 3% MeOH /EtOAc/ и получают чистый продукт.

Определенный выход: 70% Rf 0,40 /2% MeOH /EtOAc/.

¹H-NMR/CDCl₃ /d 9,54/, 1H, NH/; 8,21/d, J=7,6 Гц, 1H/; 7,94/d, J=8,2 Гц, 2H/; 7,59 7,24/m, 14H/; 6,83/d; J=8,4 Гц, 4H/; 6,25 /m, 1H/; 4,58 /S, 1H/; 4,46/S, 1H/; 4,17/S, 1H/; 4,07-3,80/m, 3H/; 3,77/S, 6H/; 3,39/ABg, J=3,0 Гц, 10,9 Гц, DV = 29,1, 2H/; 2,84-2,78/m, 1H/; 2,46-2,41/m, 1H/; 2,14-1,79/m, 2H/; 1,84/S, 3H/; 0,98/m, 1H/; FABMS /NBA/ :M-H⁻=987.

Пример 5. Синтез 3'-силилированного-N⁴-бензоил-2'-дезоксиди-5'-О-диметокситритил цитидина.

Метод А. Раствор N⁴-бензоил-2'-5'-О-диметокситритилцитидина /0,4 ммоль, 260 мг/ и имидазола /0,8 ммоль, 52 мг/ в CH₃CN /1,6 мл/ медленно добавляют шприцем в раствор дихлордиизопропилсилана /0,4 ммоль 72 мкл/ в CH₃CN /0,4 мл/ при -40°C /сухой лед CH₃CN/. Реакционную смесь перемешивают при -40°C в течение 30 мин, затем при комнатной температуре еще 30 мин. Реакционную смесь фильтруют и образовавшийся 3'-силилированный цитидин выделяют с помощью колоночной хроматографии /SiO₂, градиент от 60% EtOAc/гексан до 100% EtOAc и 1% MeOH/EtOAc/.

Выход: 100 мг, 28% Rf 0,71 /0,5% MeOH/EtOAc/. Было выделено также 50 мг

3'-3'-симметричного C-C димера.

¹H-NMR /300 МГц, COCl₂ /δ 8,43/d, J=7,6 Гц, 1H/; 7,88/d, J=8,2 Гц, 2H/; 7,60-7,26/m, 13H/; 6,87/d, J= 8,4 Гц, 4H/; 6,25/t, J=6,5 Гц, 1H/; 4,71/m, 1H/; 4,10/m, 1H/; 3,80/S, 6H/; 3,48/ABg, J=3 Гц, 11 Гц, DV = 30 Гц, 2H/; 2,67/m, 1H/; 2,35/m, 1H/; 0,97/m, 14H/. FABMS/TG/G/ :M+H⁺=004,6.

Метод В. Чтобы снизить образование 3',3'-симметричного димера, раствор N⁴-бензоил

2'-дезоксиди-5'-О-диметокситритилцитидина /3,08 ммоль 2,0 г/ в ДМФА /CH₃CN /5 мл/2 мл/ добавляют по каплям при -40 °C /сухой лед CH₃CN/ к раствору диизопропилсилитимидилтрифлата /3,38 ммоль, 1,0 мл/ и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридина /3,38 ммоль, 700 мг/ в CH₃CN /8 мл/. Реакционную смесь перемешивают при -40°C в течение 30 мин и продукт очищают методом ТСХ.

Пример 6. Детритилирование 5'-О-диметокситритил -3'-О-/5' диизопропилсилитимидил/тимидина.

Раствор вышеназванного соединения /22 ммоль, 200 мг/ в CH₂Cl₂ (4 мл) добавляют к 3% раствору трихлоруксусной кислоты в CH₂Cl₂ /6 мл/. Ярко-оранжевый раствор перемешивают при комнатной температуре 10 мин. Реакционную смесь вливают в 5% водный раствор NaHCO₃ /5 мл/ и экстрагируют 5% MeOH/EtOAc/. Органический слой промывают солевым раствором (10 мл) высушивают над Na₂SO₄. Сырой продукт очищают колоночной хроматографией /SiO₂, градиент 60:40 EtOAc/гексан до 10% MeOH/EtOAc/.

Полученный выход: 90 мг, 70% Pf 0,40 /10% MeOH/EtOAc/.

¹H-NMR /300 МГц, CO₃OD/ /δ 7,54/S, 1H/; 7,28/S, 1H/; 6,03/m, 2H/; 4,46/m 1H/; 4,18/m, 1H/; 3,82-3,69/m, 3H/; 3,50/m, 4H/ 2,06-1,97/m, 4H/; 1,62/S, 6H/; 0,85/m, 14H/. FABMS (TG/G) :M+H⁺=597,3.

Пример 7.

Синтез-5'-О-диметокситритил-3'-О-[5'-О-диизопропилсилитимидил-3'-О-(5'-О-диизопропилсилитимидил)]тимидина.

Индекс в Chem Abstr-Thymidine.

5'-О-[бис(1-метилэтил)силилен]-5'-О-дифосфиникотимидиллин-/5'. Fwdorw 3'/-5'-О-бис-1-метилэтил)силилен-5'-О-дифосфиникотимидиллин-/5'. fwdorw 3'/-5'-О-[бис(4-метоксифенил)фенилметил]

Метод А. Раствор 5'-О-диметокситритилтимидина /14,7 ммоль, 8,0 г/ и имидазола /29,94 ммоль, 2,0 г/ в ДМФА /40 мл/ медленно добавляют через капельную воронку к раствору дихлордиизопропилсилана /14,7 ммоль 2,72 г, 2,64 мл/ в ДМФА /10 мл/ при -40°C сухой лед CH₃CN/. Реакционную систему перемешивают

при -40°C в течение 1 ч. Раствор тимидина /14,7 ммоль, 3,66 г/ и имидазола /9,4 ммоль, 2,0 г/ в ДМФА /40 мл/ добавляют через капельную воронку. Реакционную смесь перемешивают при -40°C в течение 1 ч, затем реакцию смесь добавляют с помощью канюли в токе N₂ к раствору дихлордиизопропилсилана /14,7 ммоль, 2,72 г, 2,64 мл/ в ДМФА /10 мл/ при -40°C. Реакционную смесь перемешивают при -40°C

в течение 1 ч. Добавляют раствор тимидина /14,7 ммоль, 3,56 г/ и имидазола /29,4 ммоль, 2,0 г/ в ДМФА /40 мл/ и реакционную смесь перемешивают при -40°C в течение 1 ч. Полученную смесь по каплям вносят в интенсивно перемешиваемую смесь лед/вода /2 л/ и перемешивают 30 мин. Осадок отфильтровывают и высушивают на воздухе. Белый осадок /27 г/ хроматографируют на колонке (150 г SiO₂, градиент от 60 до 100% EtOAc/гексан) и получают чистый продукт. Полученный выход: 1,8 г, 10%

Метод Б. Раствор 5'-О-диметокситрилит-3'-О-5'-О-диизопропилосилилтимидил/тимидина /1,11 ммоль, 1,0 г/ и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридина /0,28 ммоль, 60 мг/ в ДМФА /3 мл/ добавляют шприцем к раствору диизопропилосилилбистрифлата /1,22 ммоль, 0,504 г, 0,360 мл/ и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридина /1,22 ммоль, 0,25 г/ в CH₃CN /3 мл/ при -40°C /сухой лед/ CH₃CN/. Реакционную смесь перемешивают 1 ч при -40°C. Добавляют раствор имидазола /1,22 ммоль, 0,16 г/ в CH₃CN /2,5 мл/ и реакционную систему доводят до комнатной температуры. Добавляют раствор тимидина /1,11 ммоль, 0,269 г/ в ДМФА /2 мл/ и реакционную смесь перемешивают 1 ч и добавляют по каплям к интенсивно перемешиваемой смеси лед-вода (1 л) и перемешивают дополнительно еще 30 мин. Осадок отфильтровывают и высушивают на воздухе и получают белый осадок, который растирают в порошок с гексаном /20 мл/, чтобы выделить чистый продукт.

Полученный выход: 1,05 г 76% Rf 0,38 /5%/ MeOH/EtOAc/.

¹H-NMR /300 МГц, CDCl₃/ d 7,62/s, 1H/; 7,36-7,22/m, 11H/; 6,80/d, J=7,7, 4H/; 6,36-6,22/m, 3H/; 4,62-4,54/m, 2H/; 4,45/m, 1H/; 4,06-3,83/m, 7H/; 3,75/s, 6H/; 3,36 (AB, J=10,0 Гц, DV = 47,6 Гц 2H/; 2,45-2,30/m, 3H/; 2,28 -2,14/m, 1H/; 2,13-2,00/m, 2H/; 1,85/s, 3H/; 1,81/s, 3H/; 1,48/s, 3H/; 0,98/m, 28H.

¹³C-NMR /CDCl₃/ δ 164,54; 164,45; 164,33; 159,00; 151,12; 150,99; 144,40; 135,73; 135,51; 135,40; 13015; 128,16; 113,37; 111,54; 111,32; 111,07; 87,50; 87,02; 85,23; 85,02; 73,35; 72,98; 71,24; 63,28; 63,02; 55,15; 41,33; 40364; 40,25; 17,04; 17,00; 16,92; 12,26; 11,70; 11,59; 11,53; 11,47; FABMS (TG/G): (M+H)⁺ 1252,5.

Анал. рассчит. для C₆₃H₈₄N₆O₁₇Si₂, C 60,38; H 6,71; N 6,71; мол. вес. 1253,6. Найдено, C 60,44; H 6,84; N 6,57.

Пример 8: Детритилирование 5'-О-диметокситрилиттримера.

Раствор 5'-О-диметокситрилиттримера /0,638 ммоль, 0,80 г/ в CH₂C /12 мл/ добавляют к 3% (V/V) раствору трихлоруксусной кислоты в дихлорметане /14 мл/. Яркий оранжевый раствор перемешивают при комнатной температуре 1 ч, а затем вносят в 5% водный раствор NaHCO₃ /15 мл/ и экстрагируют 5% MeOH/EtOAc. Органический слой промывают солевым раствором /20 мл/ и высушивают над Na₂CO₄. Продукт очищают колоночной хроматографией /SiO₂, градиент EtOAc/MeOH 100% до 95%/.

Полученный выход: 420 мг, 70% Rf 0,50 (10% MeOH/EtOAc/.

¹H-NMP /300 МГц, CD₃OD /d 7,55/s, 1H/; 7,27 /m, 2H/; 6,05 /m, 3H/; 4,47 /m, 2H/ 4,16 /m, 1H/; 3,87 3,70 /m, 7H/; 3,50 /m, 2H/; 2,14 - 1,96 /m, 6H, 1,62 /s, 9H/; 0,92 /m, 28H/. FABMS TG/G: (M-H)⁺ 950.

Пример 9. Синтез 5'-О-диметокситрилит-3'-О-[5'-О-диизопропилосилилтимидил-3'-О-{(5'-О-диизопропилосилилтимидил)- 3'-О-(5'-О-диизопропилосилилтимидил)}]тимидина (тетрануклеотидного аналога).

К раствору 5'-О-диметокситрилиттримера (20 мкмоль, 25 мг) и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридина /40 мкмоль, 8,25 мг/ в ДМФА /200 мкл/ медленно добавляют шприцем к раствору диизопропилосилилбистрифлата 20 мкмоль, 6 мкл и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридина /20 мкмоль, 4,1 мг/ в ДМФА /100 мкл/ в круглодонной колбе объемом 5 мл и охлаждают до -40°C /сухой лед/ CH₃CN/. Реакционную систему перемешивают 1 ч, а затем добавляют растворы тимидина /20 мкмоль, 4,84 мг/ и имидазола/ 40 мкмоль, 2,7 мг/ в ДМФА /200 мкл/. Перемешивание при -40 °C продолжают в течение 30 мин. Реакционную смесь доводят до комнатной температуры. Добавляют водный раствор NaHCO₃ /1 мл 5% раствора/ и реакционную смесь экстрагируют CHCl₃ /2x5 мл/, промывают солевым раствором /1 мл/ и высушивают над Na₂SO₄. Продукт очищают препаративной высокоэффективной жидкостью хроматографией /HPLC/ с обращенной фазой /Vetrasphere ODS 20% 0,01 М триэтиламмоний ацетат, pH 7,5, 80% CH₃CN/.

Полученный вход: 10 мг, 31% Rf 0,16 /5% MeOH/ EtOAc/.

¹H-ЯМР /300 МГц, CDCl₃/ d 7,65 /s, 1H/; 7,39 7,26 /m, 12H/; 6,85 /a, J 7,7 Гц, 4H/; 6,38 6,27 /m, 4H/; 4,66 4,45 /m, 4H/; 4,10 3,85/m, 10H/; 3,80 /s, 6H/; 3,39 /AB q, J 11 Гц, DV = 45 Гц 2H/; 2,45 2,08 /m, 8H/; 1,92 /s, 3H/; 1,90 /s, 3H/; 1,87 /s, 3H/; 1,56 /s, 3H/; 1,03 /m, 42H/; FABM (T^g/G): (M+H)⁺ 1608,3; (M+Na)⁺ 1630,0.

Пример 10. Синтез пентатимидилнуклеотидного аналога с сильными связями.

Раствор 5'-О-диметокситрилиттримера /58,4 мкмоль, 73 мг/ и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридина /29,2 мкмоль, 6 мг/ в ДМФА /600 мкл/ медленно добавляют шприцем к раствору диизопропилосилилбистрифлата /58,4 мкмоль, 17,5 мкл/ и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридина /58,4 мкмоль, 12 мг/ в ДМФА /300 мкл/ в круглодонной колбе объемом 5 мл и охлаждают до -40°C /сухой лед /CH₃CN/. Реакционную систему перемешивают 1 ч и добавляют раствор детритилированного димера /55,5 мкмоль, 50,6 мг/ и имидазола /100 мкмоль, 6,75 мг/ в ДМФА /300 мкл/. Реакционную смесь перемешивают в течение 1 ч при -40°C, затем доводят до комнатной температуры. Добавляют водный раствор NaHCO₃/ 2 мл 5% раствора/ и смесь экстрагируют CHCl₃ /2x10 мл/, промывают солевым раствором /2 мл/ и высушивают над

Na_2SO_4 , получают готовый продукт.

FABMS (TG/G) /M + H⁺ 1961. Фрагменты ионов при 1900, 1607, 1252, 896 и 544. FABMS (NBA) /M H⁺ 1961.

Пример 11. Твердофазный синтез тимидиндекануклеотида.

А. Синтез мономерного синтетического звена. Диизопропилсилилбистрифлат /2 ммоль, 0,60 мл/ добавляют шприцем к раствору 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридина /2 ммоль, 0,41 г/ в CH_3CN /5 мл/ в круглодонной колбе объемом 100 мл в атмосфере азота. Прозрачный раствор охлаждают до -40°C /сухой лед CH_3CN / и добавляют по каплям с помощью в течение 10 минут раствор 5'-О-диметокситритилтимидина /1,84 ммоль, 1,0 г/ и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридина /0,46 ммоль, 94 мг/ в ДМФА /5 мл/. Реакционную смесь охлаждают до -40°C в течение 1 ч. Добавляют раствор имидазола /3,7 ммоль, 250 мг/ в ДМФА /4 мл/, затем разводят CH_3CN /5 мл/ до конечной концентрации 0,1 М.

Б. Синтез декануклеотида. Смесь доводят до комнатной температуры и используют в процессе твердофазного автоматического синтеза декануклеотида.

¹H-ЯМР /300 МГц, CD_3OH / δ 7,55 7,47/m, 10H/; 6,23 - 6,33/m, 10H 4,69 /S, br, 9H/; 4,40 /S, br, 1H/; 4,10 3,40 /m, 19H, 3,25 - 2,08 /m, 1H/; 2,55 2,20 /m, 20H/; 1,87 (S, br, 27H/; 1,30 /S, br, 3H/ 1,08 /m, 126H/. FABMS (TG/G) (M H⁺)⁺ 3434,2; /M + H⁺ 3433,7. FABMS (NBA) /M H⁺ 3432,2.

Мол. формула $\text{C}_{154}\text{H}_{248}\text{N}_{20}\text{O}_{50}$. Вычисл. значение мол. веса 3432,5.

Пример 12. Синтез 5'-О-диметокситритил-3'-О-(5'-О-диметокситритил-3'-О-5'-О-диизопропилсилилтимидил/тимидин-3-N, N-диизопропил-2-цианозтил/фосфорамидита.

5'-О-диметокситритилдимер /0,1 ммоль, 90 мг/ выделяют упариванием из смеси тетрагидрофуран-пиридин /6 мл, соотношение 2:1/ дважды, растворяют в ТГФ /500 мкл/ и добавляют каплями шприцем к перемешиваемому раствору 4-диметиламинопиридина /4 мг/, диизопропилэтиламина перегнанного над CaH_2 /0,4 ммоль, 87 мкл/ и 2-цианозтил-N, N-диизопропилхлорфосфорамидита /0,15 ммоль, 28,77 мкл/ в ТГФ /500 мкл/ под током азота при комнатной температуре. Реакционную систему перемешивают в течение 2 ч. Чтобы удалить следы 5'-О-диметокситритил

-3'-О-/5'-О-диизопропилсилилтимидил/тимидина, дополнительно добавляют 2-цианозтил-N, N-диизопропилхлорфосфорамидит /0,025 ммоль, 5 мкл/. Реакционную смесь перемешивают 1 ч, вносят в EtOAc /10 мл, предварительно промытого 5 мл солевого раствора/, промывают солевым раствором /2 x 2 мл/ и высушивают над Na_2SO_4 .

Сырой продукт очищают колоночной хроматографией (SiO_2 , 1: 1 EtOAc /гексан).

Полученный выход: 82 мг, 74,5% Rf 0,70 /1% MeOH / EtOAc /.

¹H-ЯМР /300 МГц, CDCl_3 /d 8,96 / S, br, 1H; NH; 7,64 /S, 1H/; 7,40 7,22 /m, 10H/; 6,84 d, J 8,8,4H/; 6,40 /t, J 6,5 Гц, 1H/;

6,27 /t, J 6,5 Гц, 1H/; 4,67 /m, 1H/; 4,53 /m, 1H/; 4,10 /m, 2H/; 3,93 /m, 1H/; 3,87 /m, 1H/; 3,80 (S, 6H/; 3,61 /m, 1H/; 3,39 /AB, f, J 4 Гц, 10 Гц, DV = 42 Гц, 2H/; 2,64 (m, 2H/; 2,53 2,05 (m, 4H/; 1,86 /S, 3H/; 1,51 /S, 3H/; 1,26 /m, 2H/; 1,17 /m, 12H/; 1,01 /m, 14H/.

¹³C-ЯМР / CDCl_3 / 163,58; 163,44; 158,72; 150,14; 144,18; 135,47; 135,25; 129,99; 127,99; 127,16; 117,58; 113,26; 111,16; 111,02; 110,94; 86,96; 86,23; 85,82; 85,74; 84,90; 84,74; 84,64; 73,41; 73,22; 63,40; 62,89; 62,70; 58,25; 58,17; 57,98; 57,87; 55,23; 43,36; 43,17; 41,47; 39,69; 39,47; 24,52; 24,44; 22,96; 20,42; 20,32; 17,24; 17,05; 12,44; 11,92; 11,71; 11,57; ³¹P-ЯМР / CDCl_3 , сравнимый с H_3PO_4 / δ 149,16; K/KB / 3192; 3058; 2965; 2932; 2868; 2838; 2246; 1693; 1608; 1510; 1465; 1392; 1382; 1365; 1322; 1289; 1274; 1251; 1251; 1199; 1179; 1158; 1129; 1084; 1064; 1035; 1003; 978; 913; 885; 828; 812; 794; 773; 756; 727; 702 cm^{-1} , FABCS /NBA/ /M + H⁺ 1099.

Анал. рассчит. для $\text{C}_{56}\text{H}_{75}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{PSi}$ C 61,19; H 6,88; N 7,64; мол. вес 1100. Найдено: C 60,60; H 6,87; N 7,60.

Пример 13. Синтез 5'-О-диметокситритил-3'-О-[5'-О-диизопропилсилилтимидил-3'-О-(5'-О-диизопропилсилилтимидил)]тимидин-3'-N, N-диизопропил-2-(цианозтил)фосфорамидита /тримера/.

5'-Диметокситритил-тример /0,44 ммоль, 550 мг выделяют упариванием из смеси ТГФ (20 мл) /пиридин (10 мл) дважды, растворяют в CH_2Cl_2 -2 мл/ и добавляют каплями с помощью шприца к перемешиваемому раствору 4-диметиламинопиридина /20 мг/, диизопропилэтиламина /перегнанного над CaH_2 , 1,69 ммоль, 370 мкл/ и 2-цианозтил-N, N

-диизопропилхлорфосфорамидита /0,34 ммоль, 120 мкл/ в CH_2Cl_2 /2,0 мл/ под током N_2 при 0°C . Реакционную смесь затем доводят до комнатной температуры, перемешивают 1 ч, вливают в 50 мл EtOAc (предварительно промытого 25 мл солевого раствора), промывают солевым раствором /2 x 20 мл/ и высушивают над Na_2SO_4 . Сырой продукт очищают колоночной хроматографией /10 г SiO_2 , EtOAc /.

Полученный выход: 320 мг; 64% Rf 0,76/ EtOAc /.

¹H-ЯМР /300 МГц, CDCl_3 /d 7,63 /S, 1H/; 7,41 7,22 /m, 11H/; 6,83 /d, j 7,8 гц, 4H/; 6,40 6,24 /m, 3H/; 4,67 4,54 /m, 3H/; 4,13 3,85 /m, 7H/; 3, 75 /S, 6H/; 3,55 /m, 2H/; 3,48 3,28 /m, 2H/; 2,74 /t, J 6 Гц, 2H/; 2,45 2,03 fm, 6H/; 1,88 /S, 3H/; 1,83 /S, 3H/; 1,50 /S, 3H/; 1,28 1,13 /m, 14H/; 1,00 /m, 28H/; FABMS(NBA): /M H⁺ 1453.

Пример 14. Синтез 5'-О-диметокситритил-3'-О-/3'-О-диизопропилсилил-5'-О-диметокситритилтимидил /тимидинат/3',3'-димера.

При получении 3', 5'-тимидинтимидинового димера с применением способа силилирования, описанного в примере 13,3',3'-димер рассматривали основным побочным продуктом. Этот димер был выделен из неочищенного продукта реакции

/800 мг/ колоночной хроматографией (SiO₂, градиент от 60 до 90% EtOAc /гексан).

Rf 0,41 (60% EtOAc/гексан).

¹H-ЯМР /300 МГц, CDCl₃/S 9,95/ br, 1H, NH/; 8,63 /S, br, 1H, NH/; 7; 51 /S, 2H/; 7,35 7,15 /m, 18 H/; 6,77 /d, J 8,7 Гц, 8H/; 6,34/m, 2H/; 4,57/d, J 4,3 Гц, 2H/; 3,91 /S, 2H/; 3,71/S, 12H/; 3,24/ABg, J 6,8 Гц, 10,7 Гц, DV = 54 Гц, 4H/; 2,46 /m, 2H/; 2,26 /m, 2H/; 1,46 /S, 6H/; 0,88 /m, 14H/. FABMS /NBA/ :M-H⁺ 1200,1.

Пример 15. Синтез N⁶-бензоил-2'-дезоксидеокси-5'-O-диметокситритил-3'-O-/3'-O-диизопропилсиллил N⁶-бензоил-2'-дезоксидеокси-5'-O-диметокситритиладенозил/аденозина.

При получении 3'5'-аденозинтимидинового димера 3',3'-димер рассматривали в качестве основного побочного продукта стадии силилирования. Порцию этого неочищенного продукта очищают методом препаративной ТСХ (1 мм SiO₂, 3% MeOH/EtOAc) и получают чистое вещество.

Rf 0,45 (90% EtOAc/гексан). ¹H-ЯМР /300 МГц, CDCl₃/ d 8,60 /S, 2H/; 8,14 /S, 2H/; 8,00/d, J 8 Гц, 2H/; 7,62/ 2H/; 7,57 7,04 (m, 22H/; 6,73/d, J 9 Гц, 8H/; 6,38/m, 2H/; 4,79 /m, 2H/; 4,14 /m, 2H/; 3,68/S, 12H/; 3,52 3,24 /m, 4H/; 2,86/m, 2H/; 2,51 /m, 2H/; 0,98 /m, 14H/. FABMS /NBA/ :M+H⁺ 1428,3; /M-H⁺ 1426,4.

Пример 16. Синтез N⁴-бензоил-2'-дезоксидеокси-5'-O-диметокситритил-3'-O-/3'-O-диизопропилсиллил-N⁴-бензоил-2'-дезоксидеокси-5'-O-диметокситритилцитидил/цитидина.

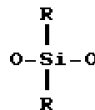
При силилировании N⁴-бензоил-2'-дезоксидеокси-5'-O-диметокситритилцитидина с использованием методики, описанной в примере 15, 3',3'-димер считали основным побочным продуктом. Этот димер выделяют из неочищенной реакционной смеси колоночной хроматографией /SiO₂, градиент от 60 до 100% EtOAc/гексан до EtOAc/MeOH/ и получают названное соединение.

Rf 0,31 /1% / MeOH/EtOAc/. ¹H-ЯМР /300 МГц, CDCl₃/ d 8,82 /S, br, 1H, NH/; 8,28 /d, J 8 Гц, 1H/; 8,25 /d, J 8 Гц, 1H/; 7,89 /m, 4H/; 7,63 7,24 /m, 26H/; 6,85 /m, 8H/; 6,23 /m, 2H/; 4,57/m, 2H/; 4,20/m, 2H/; 3,80/S, 12H/; 3,50 3,23 /m, 4H/; 2,60/m, 2H/; 2,15/m, 2H/; 0,96/m, 14H/; FABMS /NBA/ :M+H⁺ 1379, 2; /M-H⁺ 1378,2.

Формула изобретения:

1. Способ соединения нуклеозидов 3'-5'-межнуклеотидным силильным звеном, включающий реакцию взаимодействия 3'-силилированного -5'-защищенного нуклеозида с другим нуклеозидом в растворителе в присутствии катализатора основного характера, отличающийся тем, что в качестве другого нуклеозида используют незащищенный нуклеозид, а в качестве катализатора основного характера основной катализатор, создающий стерические помехи.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что силильное звено имеет формулу



5 где каждый R независимо друг от друга алкил C₁ C₆.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что R изопропил или метил.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что реакция взаимодействия включает силилирование 5'-защищенного нуклеозида бифункциональным силилирующим реагентом до образования силилированного нуклеозида, взаимодействие с незащищенным нуклеозидом с незащищенным нуклеозидом в присутствии катализатора основного характера с последующим повторением первых двух стадий до образования олигонуклеотидного аналога.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что силилированный нуклеозид и незащищенный нуклеозид являются мономерными нуклеозидами.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что мономерный нуклеозид выбирают из группы соединений, содержащей тимидин, N⁶ бензоилдезоксаденозин, N⁴ бензоилдезоксцитидин и N² изобутилдезоксигуанозин.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что силилированный нуклеозид является 3'-концевым нуклеозидом олигонуклеотида или олигонуклеотидного аналога.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что незащищенный нуклеозид является 5'-концевым нуклеозидом олигонуклеотида, или олигонуклеотидного аналога, в которых 3'- и 5'-концевые нуклеозиды не защищены.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что реакцию взаимодействия осуществляют в апротонном растворе.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что реакцию взаимодействия осуществляют в нейтральном или щелочном апротонном растворе.

11. Способ по п.9, отличающийся тем, что апротонный раствор содержит 2,6-ди-трет.бутил-4-метилпиридин в смеси ацетонитрила и диметилформамида.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что катализатором основного характера, создающим стерические помехи, является 2,6-ди-трет.бутил-4-метилпиридин.

13. Способ по п.4, отличающийся тем, что бифункциональный силилирующий реагент имеет формулу



55 где каждый R независимо друг от друга алкил C₁ C₆, а каждый R¹ удаляемая группа.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что каждый R¹ Cl или SO₂SF₃.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что каждый R независимо друг от друга изопропил или метил.