

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

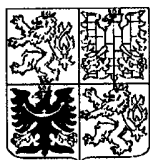
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2629-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14. 06. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.02.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/603506**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12. 05. 99**
(Věstník č. 5/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/10418**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/31009**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 H 21/00
C 07 H 19/10
C 07 H 19/20

(71) Přihlášovatel:

LYNX THERAPEUTICS, INC., Hayward, CA,
US;

(72) Původce:

Hirschbein Bernard L., San Francisco, CA,
US;

Fearon Karen L., Union City, CA, US;
Gryaznov Sergei M., San Mateo, CA, US;
McCurdy Sarah N., San Mateo, CA, US;
Nelson Jeffery S., Fremont, CA, US;
Schultz Ronald G., Hayward, CA, US;

(74) Zástupce:

Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

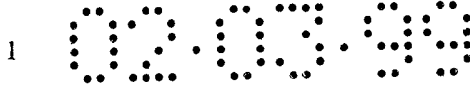
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob syntézy oligonukleotid N3 - P5
fosforamidátů na pevné fázi**

(57) Anotace:

Vynález se týká způsobu syntézy oligonukleotid N3 - P5 fosforamidátů použitím výměnné reakce aminu fosforamiditů, v níž je 3 - aminoskupina zbavená chránicí skupiny z oligonukleotidového řetězce neseného na pevné fázi zaměněna 5 -fosforamidatu vstupujícího monomeru, který má chráněnou 3 -aminoskupinu. Získaná internukleotidová fosforamiditová vazba je potom oxidována na formu stabilní chráněné fosforamidatové vazby.

CZ 2629-98 A3



09 72927

PV 2629-98

Způsob syntézy oligonukleotid N3'→P5' fosforamidatů na pevné fázi

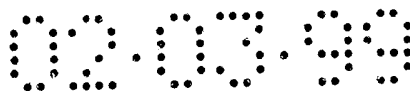
Oblast techniky:

Vynález se týká obecně chemie polymerů nukleových kyselin, a konkrétně postupů syntézy oligonukleotid N3'→P5' fosforamidatů.

Dosavadní stav techniky:

Chemie polymerů nukleových kyselin hrála významnou roli v mnoha rozvíjejících se technologiích v oblasti farmacie, diagnostiky a analytiky, a konkrétněji v podskupině antimediatorových a antigenových léčiv, kombinatorické chemii, amplifikaci signální větvené DNA, a DNA diagnostik a analýz na bázi souborů, například Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584 (1990); Milligan a kol., J. Med. Chem. 36: 1923-1937 (1993); Mesmaecker a kol., Current Opinion in Structural Biology, 5: 343-355 (1995); Thuong a kol., Angew.Chem.Int.Ed.Engl., 32:666-690 (1993); Brenner a kol., Proc.Natl.Acad.Sci., 89:5381-5383 (1992); Gold a kol., Ann.Rev.Biochem., 64: 763-797 (1995); Gallop a kol., J.Med.Chem.37: 1233-1258 (1994); Gordon a kol., J.Med.Chem.37:1385-1401 (1994); Gryaznov, Mezinárodní přihláška PCT/US94/07557; Urdea a kol., americký patent US 5 124 246; Southern a kol., Genomics, 13:1008-1017 (1992); McGall a kol., americký patent US 5 412 087; Fodor a kol., americký patent US 5 424 186; Pirrung a kol., americký patent US 5 405 783; a podobné.

Mnoho z nich bylo chemiky vedeno na zlepšení vazebné pevnosti, specifičnosti a nukleasové resistance polymerů přírodních nukleových kyselin, jako je DNA. Naneštěstí však zlepšení jedné vlastnosti, jako je nukleasová resistance, zahrnuje často záměnu za jiné vlastnosti, takové, jako je vazebná pevnost. Příklady takových záměn jsou: peptidová nukleová kyselina (PNAs) vykazuje dobrou nukleasovou resistenci a vazebnou



pevnost, ale má sníženou buněčnou absorpci v testovaných kulturách, například Habvey a kol., *Science*, 258: 1481-1485 (1992); fosforthioaty vykazují dobrou nukleasovou resistenci a rozpustnost, ale typicky jsou syntetizovány jako P-chirální směsi a vykazují řadu sekvenčně nespecifických biologických účinků, například Stein a kol., *Science*, 261: 1004-1012 (1993); methylfosfonáty vykazují dobrou nukleasovou resistenci a buněčnou absorpci, ale také jsou typicky syntetizovány jako P-chirální směsi a mají sníženou stabilitu dvoušroubovice, například Mesmaeker a kol (citovaný výše); a tak dále.

V nedávné době byla objevena nová třída oligonukleotidů majících tak zvané N3'→P5' fosforamidatové internukleosidové vazby, které vykazují velmi přijatelné vazebné vlastnosti, nukleasovou resistenci a rozpustnost, Gryaznov a Letsinger, *Nucleic Acids Research*, 20: 3403-3409 (1992); Chena kol., *Nucleic Acids Research*, 23: 2661-2668 (1995); Gryaznov a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 5798-5802 (1995); a Gryaznov a kol., *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 3143-3144 (1994). Nízké výtěžky syntéz těchto sloučenin se zveřejněnými protokoly však naneštěší zamezují jejich komerčnímu využití.

Použití této nové třídy oligonukleotidových analogů by mělo být výrazně zvýšeno, pokud budou nalezeny modifikace a nová pojetí syntéz, která zlepší výtěžky syntéz bez ztrát jakýchkoliv jiných vlastností z vlastních vynikajících vlastností uvedených výše.

Podstata vynálezu:

S ohledem na výše uvedené je důležitým předmětem našeho vynálezu poskytnutí nového řešení syntéz v pevné fázi oligonukleotid N3'→P5' fosforamidatů, při nichž jsou výrazně zvýšeny postupně se spojující výtěžky.

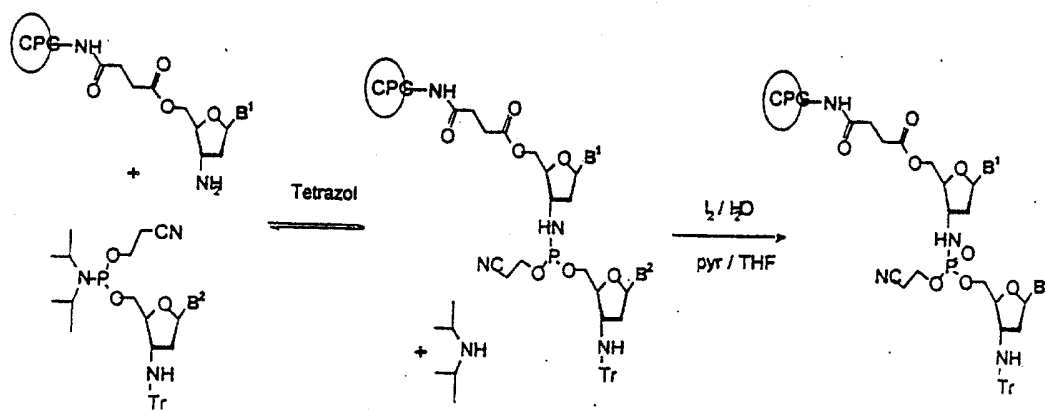
Jiným předmětem našeho vynálezu je poskytnout nové 3'-chráněné amino-5'-fosforamidatové monomery pro použití v postupu podle vynálezu.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnout praktické postupy syntéz v



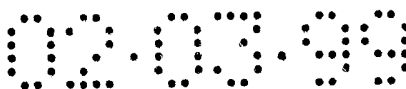
širokém měřítku pro přípravu oligonukleotid N3'→P5' fosforamidatů, zejména 2'-deoxyoligonukleotid N3'→P5' fosforamidatů.

Tyto a další předměty našeho vynálezu jsou doprovázeny poskytnutím postupu syntézy oligonukleotid N3'→P5' fosforamidatů použitím výměnné reakce aminu, v níž je 3'-aminoskupina zbavená chránicí skupiny z oligonukleotidového řetězce neseného na pevné fázi substituována aminočástí 5'-fosforamidatu vstupujícího monomeru, který má chráněnou 3'-aminoskupinu. Získaná internukleotidová fosforamiditová vazba je potom oxidována na formu stabilní chráněné fosforamidatové vazby. Obecné schema reakce je znázorněno dále.

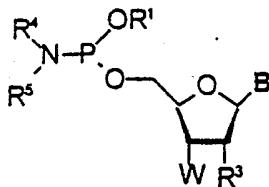


Obecně, postup podle vynálezu zahrnuje následující kroky:

- poskytnutí prvního nukleosidu navázaného na nosič z pevné fáze, první nukleosid má chráněnou 3'-aminoskupinu;
- odebrání chránicí skupiny z chráněné 3'-aminoskupiny na formu volné 3'-aminoskupiny;
- reakci volné 3'-aminoskupiny s monomerem 3'-chráněným aminonukleosid-5'-fosforamiditem za vzniku internukleosidové N3'→P5' fosforamiditové vazby;
- oxidaci uvedené vazby;
- opakování kroků (b) až (d), až je syntetizován požadovaný oligonukleotid N3'→P5' fosforamidat. Výhodně je dusíkovou částí 5'-fosforamiditu ze 3'-chráněného aminonukleosid-5'-fosforamiditového monomeru stericky bráněný amin, který má pK_a alespoň 10.



Vynález dále zahrnuje 3'-chráněné-aminonukleosid-5'-fosfor-amiditové monomery následujícího vzorce, přičemž tyto monomery jsou zejména vhodné pro postup podle vynálezu:



kde: B je pyrimidin, purin, nebo jejich analog; R^1 je fosfátová chránicí skupina; W je buď $-NHR^2$ nebo $-OR^7$, kde R^2 je amin chránicí skupina a R^7 je hydroxyl chránicí skupina; R^3 je vodík, hydroxyl, fluor nebo $-OR'$, kde R' je alkyl s 1 až 3 atomy uhlíku nebo 2'-hydroxyl chránicí skupina, jako je alkylsilyl, např. t-butyldimethylsilyl, nebo podobné; a R^4 a R^5 dohromady s dusíkem, na který jsou navázány, tvoří alkylaminovou nebo arylaminovou odstupující skupinu, která má do 40 atomů uhlíku a/nebo heteroatomy vybrané ze skupiny sestávající z kyslíku, síry a dusíku.

Monomery s W jako $-OR^7$ jsou zejména vhodné pro syntetizování chimerických oligonukleotidů obsahujících $N3' \rightarrow P5'$ fosforamidatové vazby i další vazby, jako fosfodiesteru, fosforthioátu a podobné.

Vynález překonává kritické nedostatky postupů syntéz oligonukleotid $N3' \rightarrow P5'$ fosforamidatů, majících buď plně amidované nebo částečně amidované vazby, známých ze stavu techniky, a otevírají cestu pro komerční širokou výrobu takových sloučenin. Konkrétně poskytuje vynález značně zvýšené výtěžky interakcí při použití mnohem nižších molárních ekvivalentů monomerních reaktantů, které, naopak, umožňují komerčně proveditelné syntézy oligonukleotid $N3' \rightarrow P5'$ fosforamidatů. Vynález umožní rozsáhlou aplikaci sloučenin v širokém poli působení, včetně vědeckého a průmyslového výzkumu, léčiv a diagnostik.

Popis obrázků:

Obrázek 1 je ^{31}P -NMR spektrum směsi N6-benzoyl-3'-tritylamino-2'-



deoxyadenosin-5'-(2-kyanoethyl-N,N-diisopropyl)-fosforamiditu a tetrazolu.

Obrázek 2 je ^{31}P -NMR spektrum směsi 3'-tritylaminothymidin-5'-(2-kyanoethyl-(2,2,6,6-tetramethylpiperidiny)-fosforamiditu a tetrazolu.

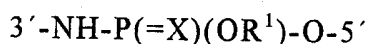
Obrázek 3a a 3b jsou chromatogramy iontové výměny dvou surových oligonukleotid $\text{N}3' \rightarrow \text{P}5'$ fosforamidatů syntetizovaných amino-výměnnou reakcí podle vynálezu.

Obrázek 4 je HPLC chromatogram iontové výměny surové reakční směsi ze syntézy oligo-2'-fluornukleosid $\text{N}3' \rightarrow \text{P}5'$ fosforamidatu z příkladu 19.

Definice

Kdykoliv je oligonukleotid vyjádřen sekvencí písmen, jako je „ATGUCCTG“, je zřejmé, že nukleotidy jsou v pořadí $5' \rightarrow 3'$ zleva doprava a že „A“ označuje deoxyadenosin, „C“ označuje deoxycytidin, „G“ označuje deoxyguanosin, „T“ označuje thymidin a „U“ označuje deoxyuridin, pokud není uvedeno jinak.

Jak se používá zde, „ $\text{N}3' \rightarrow \text{P}5'$ fosforamidat“ znamená internukleosidovou vazbu ve formě:



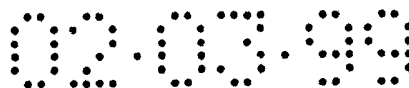
kde 3' a 5' označují atom uhlíku v částech cukru v po sobě jdoucích nukleosidech, které jsou navázány pomocí vazby, a kde R^1 je vodík nebo fosfát chránící skupina, a X je chalkogen, výhodně kyslík nebo síra. Přesněji, pokud R^1 je fosfát chránící skupina, může jí být alkyl, alkenyl, aryl, aralkyl nebo cykloalkyl obsahující do 10 atomů uhlíku. Výhodně, pokud R^1 je fosfát chránící skupina, je jí alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku; β -substituovaný ethyl odebírající elektrony, konkrétně β -trihalogenmethyl-, β -kyano-, β -sulfo- nebo β -nitro-substituovaný ethyl; elektron odebírající substituovaný fenyl, zejména halogen-, sulfo-, kyano- nebo nitro-



substituovaný fenyl; nebo elektron odebírající substituovaný fenylethyl. Výhodněji, pokud R^1 je fosfát chránící skupina, může jí být methyl, β -kyanoethyl nebo 4-nitrofenylethyl. Výhodněji, R^1 je vodík, methyl nebo β -kyanoethyl. Elektron odebírajícími substituenty jsou typicky halogenový substituent, kyanosubstituent, nitrosobstituent, sulfosubstituent nebo mono-, di- nebo trihalogenmethyl, a podobné. Atomy halogenu jako substituenty jsou obvykle fluor, chlor, brom nebo jod; výhodně jsou jimi atomy fluoru a chloru. „Elektron odebírající“ označuje snahu substituentu přitahovat valenční elektrony molekuly, jíž je částí, to znamená, že je elektronegativní, viz. Březen, *Advanced Organic Chemistry*, str. 16-18 (John Wiley, New York, 1985). Návod pro výběr fosfát chránící skupiny je poskytnut v Beaucage a Iyer, *Tetrahedron* 48:2223-2311 (1992). Pro pohodlnost jsou zde někdy nukleotidové fosforamidaty označovány dolním indexem „np“ nebo „pn“ pro $N3' \rightarrow P5'$ fosforamidaty, resp. $P3' \rightarrow N5'$ fosforamidaty. Tudíž „ $U_{np}U$ “ je dinukleotid, v němž 3'-aminouridin a uridin jsou navázány $N3' \rightarrow P5'$ fosforamidatovou vazbou. Obdobně jsou 2'-fluorsubstituenty označovány horním indexem „f“. Tudíž „ U_{np}^fU “ je dinukleotid, v němž 5'-většina 3'-amino-2'-fluoridinu je navázána na uridin $N3' \rightarrow P5'$ fosforamidatovou vazbou. Jednotlivé úvodní písmeno, jako dolní index, „p“, označuje 5' monofosfat, a jednotlivé připojené jako dolní index „n“ označuje 3'-aminoskupinu.

Jak se zde používá termín „ $N3' \rightarrow P5'$ fosforamiditová vazba“ (vloženno zdůraznění), týká se forforitého (III) meziprojektu $N3' \rightarrow P5'$ fosforamidatové vazby. V souladu s vynálezem je $N3' \rightarrow P5'$ vazba tvořena oxidováním $N3' \rightarrow P5'$ fosforamiditové vazby.

„Nukleosid“, jak se zde používá, zahrnuje přírodní nukleosidy, včetně 2'-deoxy a 2'-hydroxylových forem, např. jak je popsáno v Kornberg a Baker, *DNA Replication*, 2. vyd., (Freeman, San Francisco, 1992). „Analogy“ v odkazech na nukleosidy zahrnují syntetické nukleosidy, které mají modifikované bázičké části a/nebo modifikované části cukrů, např. jak popsal Sheit, *Nucleotide Analogs* (John Wiley, New York, 1980). Tyto analogy zahrnují syntetické nukleosidy určené pro zlepšení vazebných



vlastností, jako stability, specificity, nebo podobných, jako jsou popsány Uhlmannem a Peymanem (citované výše).

„Pyrimidin“, jak se zde používá, označuje pyrimidiny vyskytující se v přírodních nukleosidech, zahrnujících cytosin, thymin, a uracil, a jejich běžné analogy, jako jsou ty, které obsahují oxy-, methyl-, propinyl-, methoxy-, hydroxyl-, amino-, thio-, halogen- a podobné substituenty. Termín, jak se zde používá, zahrnuje dále pyrimidiny s navázanou běžnou chránicí skupinou, jako je N⁴-benzoylcytosin. Další běžné chránicí skupiny pyrimidinu popsali Beaucage a Iyer (citování výše).

„Purin“, jak se zde používá, označuje puriny, které se vyskytují v přírodních nukleosidech, zahrnující adenin, guanin, a hypoxanthin, a jejich běžné analogy, jako ty, které obsahují oxy-, methyl-, propinyl-, methoxy-, hydroxyl-, amino-, thio-, halogen- a podobné substituenty. Termín, jak se zde používá, zahrnuje dále puriny s navázanou běžnou chránicí skupinou, jako je N²-benzoylguanin, N²-isobutyrylguanin a N⁶-benzoyladenin. Další běžné chránicí skupiny purinu popsali Beaucage a Iyer (citování výše).

„Oligonukleotid N3'→P5' fosforamidat“ označuje oligomer, obvykle lineární, z nukleosidových podjednotek spojených alespoň jednou N3'→P5' fosforamidatovou vazbou. Nukleosidové podjednotky obvykle obsahují nukleosidy nebo analogy nukleosidů, ale mohou také obsahovat více obvyklé části, které mají kompatibilní chemické chování, jako jsou báze cukry a jiné uhlovodíkové části, jako které jsou popsány v následujících referencích: Newton a kol., *Nucleic Acids Research*, 21:1155-1162 (1993); Griffin a kol., *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 7976-7982 (1992); Jaschke a kol., *Tetrahedron Letters*, 34: 301-304 (1992); Ma a kol., Mezinárodní přihláška PCT/CA92/00423; Zon a kol., Mezinárodní přihláška PCT/US90/06630; Durand a kol., *Nucleic Acids Research*, 18; 6353-6359 (1990); Salunkhe a kol., *J. Am. Chem. Soc.*, 114:8768-8772 (1992); a podobné. Výhodněji termín označuje oligonukleotid, kde jsou všechny internukleosidové vazby nahrazeny N3'→P5' fosforamidatovými vazbami, tedy tento výraz se částečně chápe jako plně „amidované“ oligomery. Ještě výhodněji označuje oligonukleotid, kde jsou všechny oligonukleotidové vazby nahrazeny



N3'→P5' fosforamidatovými vazbami a kde nukleosidové podjednotky jsou přírodní nukleosidy nebo jejich analogy. Oligonukleotid N3'→P5' fosforamidat podle vynálezu, v němž každá vazba je N3'→P5' fosforamidatová vazba („plně amidovaná“), může být zakotven v nebo navázán na jiné oligonukleotidy nebo polynukleotidy za vzniku velkého oligomeru, který je „částečně amidován“. Například plně amidovaný oligonukleotid N3'→P5' fosforamidat $A_{np}A_{np}G_{np}C_{np}C_n$ je zakotven do velkého oligonukleotidu GGCCAAA $A_{np}A_{np}G_{np}C_{np}C_{np}$ ACTAT (SEQ ID NO:1), nebo je navázán na „TTTATC“ jako větší oligonukleotid: $A_{np}A_{np}G_{np}C_{np}C_{np}$ TTTATC (SEQ ID NO:2). Tyto chimerické oligonukleotidy, které mohou být použity jako PCR primery, záchytné sondy, a podobné, jsou zahrnuty do rozsahu vynálezu.

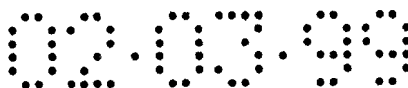
Termín „oxidovat“, „oxidace“, a podobné termíny, jak se zde používají, ve spojení s internukleosidovou vazbou obsahující fosfor, znamenají způsob nebo zpracování pro konverzi atomu fosforu ve vazbě z formy fosforu (III) na formu fosforu (V).

Termín „fosforamiditová aminoskupina“, jak se zde používá, označuje aminoskupinu, $-NR^4R^5$, navázanou na atom fosforu z fosforamiditové skupiny, a termín „fosforamiditový dusík“ označuje atom dusíku z fosforamiditové aminoskupiny.

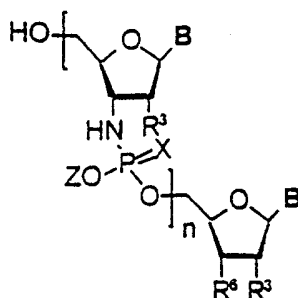
Termíny „sterické bránění/chránění“, „stericky bráněný/chráněný“ a podobné, jak se zde používají, označují účinek „objemných“ skupin na chemickou reaktivitu, např. Morrison a Boyd, Organic Chemistry, str. 603 (Allyn a Bacon, Boston, 1978).

Detailní popis vynálezu:

Vynález je veden na metodu syntézy, v pevné fázi, oligonukleotid N3'→P5' fosforamidatů, v nichž probíhá spojování fosforamiditových monomerů na volnou aminoskupinu růstového řetězce přes výměnu fosforamiditové aminoskupiny monomeru s volnou 3' aminoskupinou růstového řetězce. Výhodně jsou oligonukleotid N3'→P5' fosforamidaty



připravené postupem podle vynálezu popsány vzorcem:

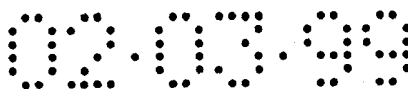


kde: B je purin nebo pyrimidin nebo jejich analog; X je chalkogen, výhodně kyslík nebo síra, a ještě výhodněji kyslík; R^3 je vodík, fluor nebo hydroxyl, přednostně vodík; R^6 je aminoskupina nebo hydroxyl; Z je vodík nebo kationtový protiion, jako je alkalického kovu, aminový kation jako je amonium, triethylamonium nebo podobné. Výhodně je n v rozmezí od 1 do několika set; výhodněji n je v rozmezí od asi 1 do asi 50; a nejvýhodněji n je v rozmezí od 1 do 30.

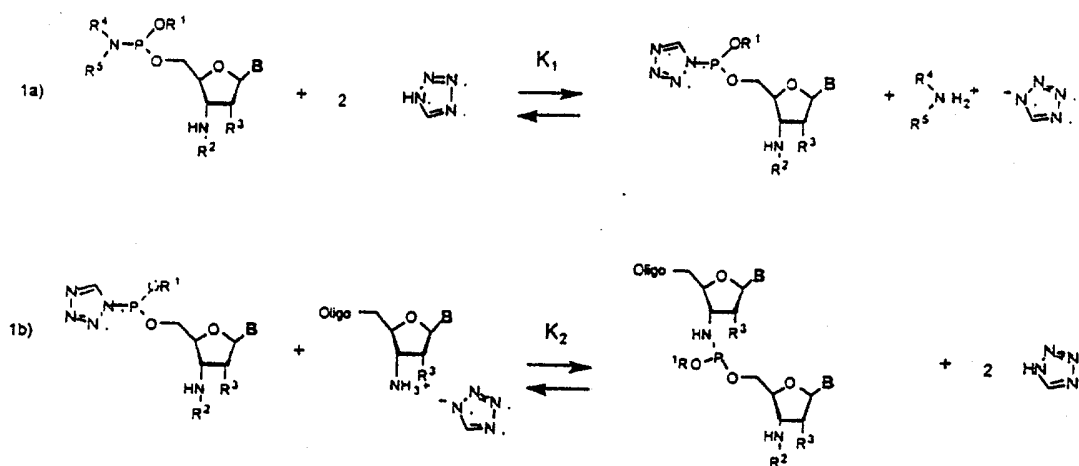
Výhodně mají oligo-2'-fluornukleotid $N3' \rightarrow P5'$ fosforamidaty podle vynálezu délku mezi 2 a 30 nukleotidy. Výhodněji délky mezi 8 a 25 nukleotidy; a nejvýhodněji jsou mezi 8 a 20 nukleotidy délky.

Jak bylo zmíněno výše, zahrnují obecné kroky postupu (a) poskytnutí prvního nukleosidu navázaného na nosič z pevné fáze, první nukleosid má chráněnou 3'-aminoskupinu; (b) odebrání chránící skupiny z chráněné 3'-aminoskupiny na formu volné 3'-aminoskupiny; (c) reakci volné 3'-aminoskupiny s 3'-chráněným aminonukleosid-5'-fosforamiditovým monomerem za vzniku internukleosidové $N3' \rightarrow P5'$ fosforamiditové vazby; (d) oxidaci uvedené vazby; a (e) opakování kroků (b) až (d), až je syntetizován požadovaný oligonukleotid $N3' \rightarrow P5'$ fosforamidat.

Ačkoliv výměnná reakce aminu podle vynálezu závisí na reverzibilní rovnováze mezi reaktanty a produkty (znázorněno dále v rovnicích 1a a 1b) - na rozdíl od většiny pojetí syntéz oligonukleotidů v pevné fázi, které zahrnují nevratné slučovací kroky, uvažovaný návod pro provádění výběrů



týkajících se podmínek slučování, chránících skupin, nosičů, kterými je pevná fáze, spojovacích skupin, činidel odebírajících chránící skupiny, činidel pro odštěpení produktů z pevných nosičů, purifikace produktu a podobných ve spojení s předloženým vynálezem lze nalézt v literatuře, jako Gait, vydavatel, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL, Press, Oxford, 1984); Amarnath a Broom, *Chemical Reviews*, Vol. 77, str. 183-217 (1977); Pon a kol., *Biotechniques*, Vol.6. str. 768-775 (1988); Ohtsuka a kol., *Nucleic Acids Research*, Vol 10, str. 6553-6570 (1982); Eckstein, vydavatel (citovaný výše), Greene a Wuts (citovaní výše), Narang, vydavatel, *Synthesis and Applications of DNA and RNA* (Academic Press, New York, 1987), Beaucage a Iyer (citovaní výše) a podobných odkazech.



Ve vynálezu lze použít široké řady nosičů s pevnou fází, včetně mikročástic vyrobených ze skla s regulovanými póry (CPG), vysoce zesítěného polystyrenu, akrylových kopolymerů, celulozy, nylonu, dextranu, latexu, polyakroleinu a podobných, popsaných v následujících příkladných odkazech: *Meth.Enzymol.*, sekce A, str.11-147, vol. 44 (Academic Press, New York,

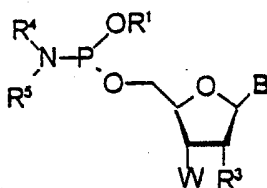


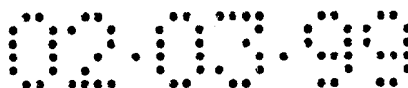
1976); americké patenty US 4 678 814; 4 413 070; a 4 046720; a Pon , kapitola 19 v Agrawal, vydavatel, Methods in Molecular Biology,

Vol. 20, (Humana Press, Totowa, NJ, 1993). Nosiče dále zahrnují polystyrenové perličky; polystyren roubovaný s polyethylenglykolem (např. TentaGel^(R), Rapp Polymere, Tubingen, Německo); a podobné. Výběr z charakteristik nosiče, jako je materiál, porozita, velikost, tvar a podobné, a použitý typ vazebné části, závisí na řadě faktorů, jako jsou použité chránící skupiny, délka výsledného produktu, množství výsledného produktu a podobné. Příkladové vazebné části jsou popsány v Pon a kol, Biotechniques, 6:768-775 (1988); Webb, americký patent US 4 659 774; Barany a kol., Mezinárodní patentová přihláška PCT/US91/06103; Brown a kol., Chem. Soc. Commun., 1989: 891-893; Damba a kol, Nucleic Acids Research, 18: 3813-3821 (1990); Beattie a kol., Clinical Chemistry, 39; 719-722 (1993); Maskos a Southern, Nucleic acids Research, 20: 1679-1684 (1992); a podobné.

Výhodnými pevnými nosiči pro použití podle předloženého vynálezu jsou CPG a polystyren roubovaný polyethylenglykolem a vykazující koncové aminoskupiny (jako TenaGel-NH₂^(R), Rapp Polymere, Tubingen Německo). Aminopropylová skupina je preferovaným spacerem mezi CPG a nukleosidovou vazbou. Preferovanou vazbou na 5'-hydroxyl z prvního nukleosidu je sukcinyllová skupina, která poskytuje báziicky nestálou esterovou vazbu, která se typicky štěpí po syntéze s vodným amoniem.

Monomery podle vynálezu zahrnují 2'-fluor-3'-chráněné aminonukleosid-5'-fosforamidaty, 2'-deoxy-3'-chráněné aminonukleosid-5'-fosforamidaty, 2'-chráněné-3'-chráněné aminoribonukleosid -5'-fosforamidaty, a jejich 3'-chráněné-3'-hydroxylové protistrany. Výhodně jsou monomery podle vynálezu definovány vzorcem:





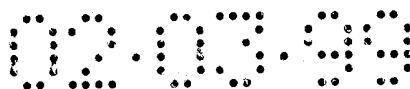
kde B, W, R¹, R³, R⁴ a R⁵ jsou definovány výše.

Výhodněji je -NR⁴R⁵ stericky chráněná aminoskupina, která může sestávat z následujících výhodných provedení:

Za prvé, R⁴ a R⁵ samostatně jsou alkyl, aralkyl, cykloalkyl nebo cykloalkylalkyl, kde R⁴ a R⁵ mají dohromady celkově od 6 do 20 atomů uhlíku. Ještě výhodněji R⁴ a R⁵ samostatně jsou alkyl mající od 1 do 8 atomů uhlíku. Při dalším výhodném provedení, R⁴ a R⁵, pokud se vezmou samostatně, jsou isopropyl, sek.butyl, isobutyl, t.butyl, cyklohexyl, nebo 2-ethylhexyl. Nejvýhodněji, vzaty samostatně R⁴ je isopropyl, zatímco R⁵ je t.butyl.

Za druhé, R⁴ a R⁵ vzaty dohromady mohou tvořit alkylenový řetězec obsahující do 12 atomů uhlíku v základním řetězci a celkově od 4 do 20 atomů uhlíku s oběma koncovými valenčními vazbami uvedeného řetězce navázanými na atom dusíku, na něž jsou navázány R⁴ a R⁵. V dalším výhodném provedení R⁴ a R⁵ vzaty dohromady tvoří alkylenový řetězec obsahující do 6 atomů uhlíku v základním řetězci a celkově od 4 do 12 atomů uhlíku s oběma koncovými valenčními vazbami uvedeného řetězce navázanými na atom dusíku, na něž jsou navázány R⁴ a R⁵.

Za třetí, R⁴ a R⁵ vzaty dohromady a s dusíkem, na něž jsou navázány, tvoří nasycený heterocykl s dusíkem, který má do 10 atomů uhlíku nebo heteroatomů v základním řetězci a celkově od 4 do 20 atomů uhlíku nebo heteroatomů společně, tak, že R⁴ a R⁵ vzaty dohromady a s dusíkem, na něž jsou navázány, obsahují do tří heteroatomů vybraných ze skupiny sestávající z dusíku, kyslíku a síry. V dalším výhodném provedení, R⁴ a R⁵ vzaty dohromady a s dusíkem, na něž jsou navázány, tvoří nasycený heterocykl s dusíkem, který má do 10 uhlíkových atomů a až tři další heteroatomy vybrané ze skupiny sestávající z dusíku, kyslíku a síry. Ještě výhodněji, R⁴ a R⁵ vzaty dohromady a s dusíkem, na něž jsou navázány, jsou pyrrolidino-, morfolino-, tetramethylguanidinyl nebo piperidino-. Ještě výhodněji, R⁴ a R⁵ vzaty dohromady a s dusíkem, na něž jsou navázány, jsou dimethylpiperidinyl, pyrrolidinyl, dimethylmorfolino-, tetramethylmorfolino-, dimethylpyrrolidinyl, tetramethylpyrrolidinyl nebo tetramethylpiperidinyl. Ještě výhodněji, R⁴ a R⁵



vzaty dohromady a s dusíkem, na něž jsou navázány, jsou 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl,

2,6-dimethylpiperidinyl, nebo 2,5-dimethylpyrrolidinyl. Nejvýhodněji, R^4 a R^5 vzaty dohromady a s dusíkem, na něž jsou navázány, je 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl.

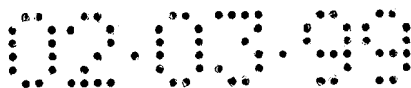
Monomery pro použití v postupu jsou výhodně 2'-deoxy-3'-chráněné aminonukleosid-5'-fosforamidity. V dalším výhodném provedení má fosforamiditová aminoskupina pK_a alespoň 10,0. Ještě výhodněji je fosforamiditová aminoskupina vybrána tak, že tetrazolová aktivační rovnovážná konstanta K_1 , jak je definována dále, a jak je měřena v příkladu 9, je vyšší než 10 M^{-1} . Ještě výhodněji je rovnovážná konstanta vyšší než 100 M^{-1} ; a nejvýhodněji je rovnovážná konstanta vyšší než 1000 M^{-1} .

Tetrazolová aktivační rovnovážná konstanta K_1 je definována takto:

$$K_1 = \frac{[\text{Tetrazolidylamidit}] [\text{R}_2\text{NH}_2^+\text{tetrazolid}^-]}{[\text{Tetrazol}]^2 [\text{monomer amidit}]}$$

kde [Tetrazolidylamidit] je rovnovážná koncentrace meziprojektu tetrazolidylamiditu, [Tetrazol] je rovnovážná koncentrace tetrazolu, [monomer amidit] je rovnovážná koncentrace fosforamiditového monomeru, a $[\text{R}_2\text{NH}_2^+\text{tetrazolid}^-]$ je rovnovážná koncentrace tetrazolidové soli aminové odstupující skupiny fosforamiditového monomeru.

Výhodně je 3'-aminochránící skupina monomeru, R^2 , v kyselině labilní skupina, jako je trifenylmethyl (jako trityl), p-anisyl-difenylmethyl (jako monomethoxytrityl nebo MMT), di-p-anisyl-fenylmethyl (jako dimethoxytrityl nebo DMT), nebo kyselě labilní urethan. Nejvýhodněji je 3'-aminochránící skupinou trifenylmethyl. Tyto chránící skupiny se odebírají zpracováním s roztoky kyselin, nejvýhodněji s roztokem 3% kyseliny dichloroctové v methylenchloridu. Obdobně, 3'-hydroxylovou chránící skupinou monomeru, R^7 , je kyselě labilní skupina, jako je trityl, MMT, DMT nebo urethan. Nejvýhodněji 3'-hydroxylovou chránící skupinou je DMT.



Jak se zde používá, termín „volná aminoskupina“ v odkazu na monomery podle vynálezu označuje aminoskupinu schopnou reagovat s

fosforamiditovou skupinou vstupujícího monomeru. Výhodně je volnou aminoskupinou primární amin. Po kroku detritylace je obvykle aminoskupina ve formě své soli s konjugátem kyseliny, použité pro detritylaci. Tato sůl může být výhodně neutralizována zásaditým roztokem, jako je 2% triethylamin nebo pyridin v acetonitrilu, po detritylačním kroku.

Krok slučování podle vynálezu se může provádět v teplotním rozmezí -20 až 200 stupňů Celsia. Výhodněji se reakce provádí při teplotě okolí (asi 15-30 stupňů Celsia). Reakce se uskutečňuje přidáním roztoku fosforamiditového monomeru a roztoku aktivátoru (nebo roztoku obsahujícího fosforamiditový monomer a aktivátor) do reakční nádoby obsahující volnou aminoskupinu (oligo)nukleotidu kovalentně vázanou na pevný nosič. Obvykle jsou aktivátory podle vynálezu nukleofilní katalyzátory, které nahradí stabilnější fosforamiditovou aminoskupinu za vzniku vysoce reaktivního (a mnohem méně stabilního) meziprojektu, který, dále, reaguje s volnou 3'-aminoskupinou pevného neseného oligonukleotid N3'→P5' fosforamidotu. Směs se potom mísí postupy, jako jsou mechanické víření, kropení inertním plynem a pod. Obdobně roztok (y) monomeru a aktivátoru mohou být připraveny tak, aby protékaly reakční nádobou (nebo kolonou) obsahující pevný nesený (oligo)nukleotid s volnou 3'-aminoskupinou. Monomer a aktivátor buď mohou být předsmíseny, míchány ve ventilovém bloku vhodného syntetizéru, míchány v předaktivací nádobě a, pokud je to žádoucí, přednastaveny do rovnováhy, nebo se mohou přidávat samostatně do reakční nádoby.

Příklady aktivátorů pro použití podle vynálezu jsou tetrazol, 5-(ethylthio)tetrazol, 5-(4-nitrofenyl)tetrazol, 5-(2-thiofen)tetrazol, triazol, pyridinium chlorid a podobné, viz např. Beaucage a Iyer (citování výše); Berner a kol., *Nucleic Acids Research*, 17:853-864 (1989); Benson, *Chem. Rev.* 41:1-61 (1947). Termín „tetrazolový aktivátor“, jak se zde používá, označuje aktivátory, kterými jsou tetrazol nebo deriváty tetrazolu. Nejvýhodnějším aktivátorem je tetrazol. Výhodnými rozpouštědly jsou acetonitril, tetrahydrofuran, methylenchlorid a podobné. Přednost se dává acetonitrilu.

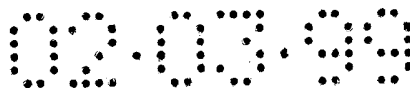


Velké opatrnosti by mělo být dbáno při použití velmi suchého (bezvodého) monomeru, aktivátoru a rozpouštědla pro krok slučování a u

rozpouštědla použitého k promytí pevného nosiče bezprostředně před slučováním.

Výběr monomeru (konkrétně výběr fosforamiditové aminoskupiny) závisí na použití. Obecně, pro účely výzkumu (0,01-10 μmol) fosforamidat oligonukleotidové syntézy použitím komerčně dostupných DNA syntézerů, jako je ABI Model 394, je vhodné použít monomer, který je relativně stabilní a relativně méně reaktivní (jak je definováno rovnovážnou konstantou K_1 *vide supra*), tak, že roztok může odcházet ze zařízení pro vícenásobnou syntézu v období týdnů. Dalším důvodem pro upřednostnění méně reaktivního monomeru pro toto použití je fakt, že zařízení tohoto typu nejsou typicky určena na minimální objem použitého reagens. Ve skutečnosti, jelikož se při syntézách ve výzkumném měřítku typicky pracuje v určitém přebytku tekoucího roztoku monomeru reakční nádobou (kolonou), odebírají se některé rozpustné produkty z kolony (a tedy z rovnovážného stavu), a takto napomáhají řízení rovnováhy do ukončení. Také cena monomeru, použitá v tomto měřítku, může být relativně méně důležitá než jiné faktory (jako je cena laboratoře, smlouvy a pod.). Obvykle pokud se použijí méně reaktivní monomery (jako diisopropylaminofosforamidity), je třeba použít relativně velké přebytky monomeru (10-50) ve srovnání s volnou aminoskupinou, a je potřeba použít velké přebytky aktivátoru k dosažení požadovaných reakčních rychlostí a konverzí (výtěžku).

K minimalizaci množství (počtu ekvivalentů) monomeru potřebného k zajištění požadovaného výtěžku reakce, zejména při použití relativně méně reaktivního monomeru a provádění syntézy v malém měřítku, jak je uvedeno výše, je velice vhodné provádět slučovací a oxidační kroky dvakrát, použitím nižší koncentrace (a méně ekvivalentů) monomeru v každém ze dvou slučovacích kroků. To je proto, neboť reakce slučování je zvrtná rovnovážná reakce (znázorněná v rovnicích 1a a 1b). Při použití tohoto postupu nejprve probíhá slučování v cyklu použitím trochu menších množství monomeru a rovnovážná koncentrace požadované fosforamiditové vazby, která se tvoří za



těchto podmínek, je potom „zamkne“ jako fosforamidat uskutečněním prvního oxidačního kroku cyklu. Potom

proběhne druhý slučovací krok, opět s relativně malými množstvími monomeru, a následuje druhý oxidační krok. Použitím tohoto postupu je potřeba celkově méně monomerů k získání požadovaného výtěžku, než když se použije všechen monomer v jediném slučování.

Ekonomie při výrobě ve velkém měřítku vyžaduje, aby bylo množství (počet ekvivalentů) použitého monomeru minimalizováno. V tomto vynálezu se obvykle cena monomeru stává větším procentickým dílem z celkových nákladů, neboť cena práce a některé další náklady se nezvyšují lineárně s rozsahem syntézy. Kromě toho oligonukleotidové syntetizéry v rozsáhlém měřítku obvykle pracují vsádkovým způsobem spíše než průtokovým postupem, který lze běžně nalézt u syntéz ve výzkumném měřítku, neboť technika řízení reakce k úplnému ukončení odebráním rozpustných produktů z nádoby není praktická. V tomto vynálezu je nezbytné vybrat monomer, který je relativně více reaktivní (jak je definováno konstantou K_1 , viz *svrchu*). Tyto monomery obvykle mají fosforamiditové aminoskupiny, které jsou relativně zásaditější a/nebo více stericky bráněné. Použití takto reaktivních monomerů umožňuje použití nižších koncentrací aktivátoru pro dosažení přiměřených reakčních rychlostí. Tyto nižší koncentrace aktivátoru napomáhají bránit zvrtné reakci požadovaného produktu s aktivátorem za vzniku aktivovaného meziprojektu (rovnice 1b). Z těchto důvodů jsou požadovány výrazně nižší množství monomeru (rovnice 1-5). Obecně je velmi důležité použít monomer nejvyšší čistoty.

Po kroku slučování je získaná fosforamiditová vazba oxidována (sulfurována) za vzniku stabilně chráněné fosforamidatové (fosforthioamidatové) vazby. Krok oxidace se může provádět bezprostředně po vypuštění slučovacího roztoku z reakční nádoby, nebo s mezitím promytým rozpouštědlem. Jelikož může být fosforamiditová vazba za přítomnosti tetrazolu hydrolyzována, promývací roztok je přednostně velmi suchý a/nebo zásaditý. Pokud není promývací krok použit, je oxidační roztok přednostně



zásaditý a/nebo velmi suchý, nebo je oxidační činidlo vybráno tak, že je dostatečně reaktivní k úspěšnému konkurování hydrolýze.

Oxidační činidla, která jsou vhodná v postupu podle vynálezu, zahrnují jod, chlor, brom, perkyseliny jako kyselinu m-chlorbenzoovou,

hydroperoxydy jako je t.butylhydroperoxid, ethylhydroperoxid, methylhydroperoxid a podobné, ozon, směsné acyl-sulfinové anhydridy jako je 3H-2,1-benzoxathiolan-3-on-1-oxid, soli persulfatů jako je sodný, amonný a persulfat tetrabutylamonný a podobné, monoperoxysulfaty jako je oxonTM, sodný a/nebo jiné chlornany, peroxydy, jako je diethylperoxid nebo bis(trimethylsilyl)peroxid, nebo peroxid vodíku nebo nevodné ekvivalenty peroxidu vodíku jako je komplex močovina/peroxid vodíku, atd. Další vhodná oxidační činidla, která mohou být použita ke konverzi fosforu (III) na fosfor (V), jsou popsána v Beaucage a Iyer (citování výše). Sulfurační činidla pro použití podle vynálezu zahrnují elementární síru, thiuram-disulfidy, jako je tetraethylthiuram disulfid, acyldisulfidy, jako je fenacyldisulfid, fosfinothioyl-disulfidy, jako je S-TetraTM, a 1,1-dioxo-3H-1,2-benzodithiol-3-on. Pro použití podle předloženého vynálezu se jako oxidačnímu činidlu dává přednost peroxidu vodíku. Výhodným provedením je použití roztoku 1,5% peroxidu vodíku, 3,5% vody, 20% pyridinu a 75% THF.

V jednom provedení vynálezu může být nezreagovaná 3'-aminoskupina, zůstávající po (posledním) oxidačním kroku v cyklu, překryta vhodným překrývacím činidlem předtím, než je další krok detritylace učiní inertními k následujícím krokům slučování. Tento krok překrytí nejenom zlepšuje HPLC profil tím, že je purifikace úspěšnější, ale také výrazně zlepšuje celkový výtěžek produktu, pravděpodobně tím, že eliminuje nezreagované 3'-aminoskupiny soupeřící v udržení rovnovážného stavu. Překrývací činidla vhodná v postupu podle vynálezu zahrnují elektrofilní reagens, taková, jako je acetanhydrid a anhydrid kyseliny isomáselné, a chloridy kyselin, jako je adamantylkarbonylchlorid, pivaoylchlorid a podobné, isothiokyanaty, chlorformiaty atd. Také jsou vhodné fosforamidity ve spojení s aktivátorem s následnou oxidací, a H-fosfonatové soli jako je isopropyl-H-fosfonat



triethylamonný používaný ve spojení s chloridem kyseliny, jako je pivaoylchlorid nebo adamantylkarbonylchlorid.

3'-Aminochránící skupiny v monomeru, jako je trityl, činí aminoskupinu méně reaktivní s fosforamiditovou skupinou monomerů a překrývacími činidly. Tato ochrana však není úplná, jako je to v případě s

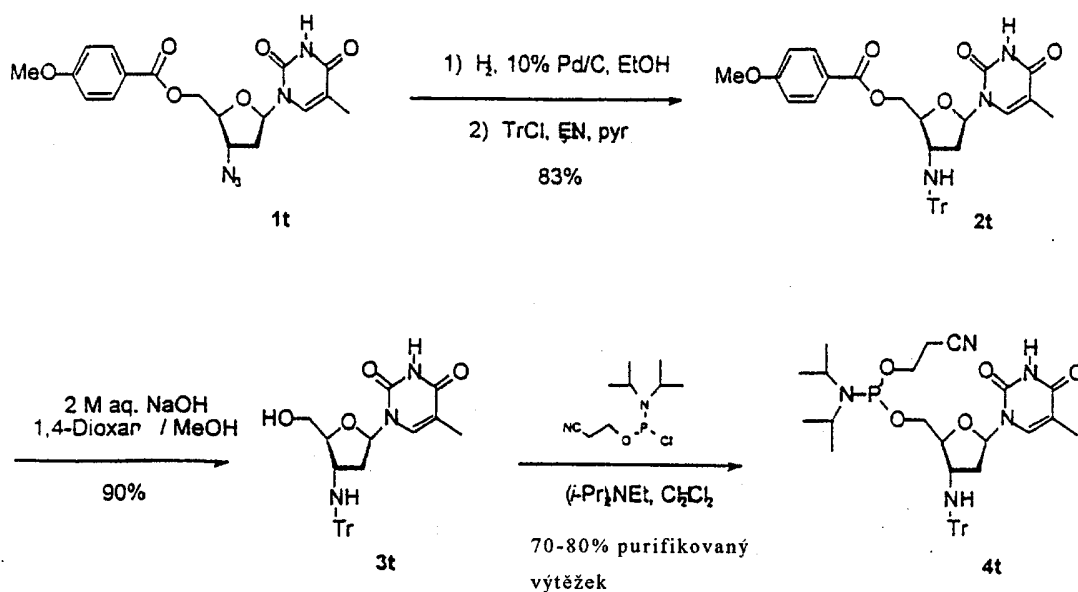
obdobně chráněnou 5'-hydroxylovou skupinou v běžných syntézách fosfodiesterů. Z tohoto důvodu se dává přednost trochu méně reaktivnímu překrývacímu činidlu, jako je anhydrid kyseliny isobutylmásečné, před acetanhydridem, nejčastěji používaným v fosfodiesterových syntézách. Může se použít buď anhydrid kyseliny isobutylmásečné, nebo acetanhydrid jako roztok 1:1:8 anhydridu:lutidinu:tetrahydrofuranu (objemově), a použít v dílech odpovídajících roztoku 1-methylimidazolu v tetrahydrofuranu, jak je dodáván PE Applied Biosystems (Foster City, CA).

Oligonukleotid se odštěpí z pevného nosiče a odstraní se z něj chránící skupiny po ukončení sestavení řetězce použitím vodného amoniaku nebo jiných prostředků, jak jsou popsány v referencích citovaných výše. Oligonukleotidy mohou být odštěpeny z nosiče se svou nedotčenou koncovou amino-chráněnou skupinou (nebo v některých případech hydroxyl- chráněnou skupinou). To je žádoucí v těch situacích, kdy se použije tritylová nebo jiná chránící skupina jako pomocná při purifikaci, jako je HPLC s reverzní fází nebo iontově-výměnná HPLC. Nicméně, pokud se použijí tritylové chránící skupiny a jsou odebrány zpracováním kyselinou po odštěpení z nosiče, odstraněním chránění a purifikací, potom je velká snaha nechráněných fosforamidatových vazeb podrobit se nežádoucímu štěpení. Proto je třeba dbát v tomto kroku velké opatrnosti.

Obdobně lze odebrat koncové amino-chránící skupiny (jako je trityl) kyselinou před odštěpením z nosiče. V tomto případě jsou fosforamidatové vazby stále ještě chráněny a fragmentaci je zabráněno. Potom se oligonukleotid odštěpí z nosiče, odebere se chránící skupina, jak je popsáno výše. Fosforamidatový oligonukleotid může být purifikován iontově-výměnnou HPLC, HPLC se reverzní fází, nebo jinými prostředky.

Příklady provedení:**Příklad 1**Příprava 2'-deoxy-3'-tritylaminothymidin-5'-fosforamiditových monomerů

Syntéza 3'-(trityl)amino-3'-deoxythymidin-5'-(2-kyanoethyl *N,N*-diisopropyl)fosforamiditu, **4t** je uvedena ve schematu I. 3'-Azido-5'-*O*-(4-methoxybenzoyl)-3'-deoxythymidin, **1t**, byl syntetizován postupem podle Czernecki a Valery, *Synthesis*, 1991:239.

Schema I



3'-(Trityl)amino-5'-(4-methoxybenzoyl)-3'-deoxythymidin, **2t**. 3'-Azido-5'-O-(4-methoxybenzoyl)-3'-deoxythymidin, **1t**, (10,0 g, 24,9 mmol) se rozpustí v ethanolu (500 ml) a redukuje se hydrogenací (60 psi H₂)(asi 413 kPa) za přítomnosti 10% Pd/C (1,0 g) po 16 h. Následuje odebrání katalyzátoru filtrací a odpaření rozpouštědla ve vakuu, získá se 92% výtěžek (8,6 g, 22,9 mmol) odpovídajícího 3'-aminu, který se odebírá přímo

pro další reakci. 5'-(4-Methoxybenzoyl)-3'-amino-3'-deoxythymidin (8,6 g, 22,9 mmol) se azeotropicky oddělí z pyridinu (2 x 50 ml) a rozpustí se v bezvodém pyridinu (50 ml). Do tohoto roztoku se přidá triethylamin (6,71 ml, 48,1 mmol) a tritylchlorid (7,0 g, 25,2 mmol). Tato směs se míchá po 2 h při teplotě okolí, a přidá se další podíl tritylchloridu (1,9 g, 6,9 mmol) a reakční směs se míchá po další 2 hodiny. Rozpouštědla se ve vakuu odstraní a surový produkt se purifikuje na sílce (2-5 % MeOH/CH₂Cl₂) za získání 90% výtěžku (12,7 g, 20,6 mmol) 3'-(trityl)amino-5'-(4-methoxybenzoyl)-3'-deoxythymidinu, **2t**.

3'-(Trityl)amino-3'-deoxythymidinu, **3t**. 5'-O-anisoyl chránící skupina se odebere rozpuštěním **2t** (30,1 g, 48,7 mmol v 57:43 1,4-dioxanu/MeOH (150 ml), následovaným přidavkem 2 M vodného NaOH (73,1 ml, 146,2 mmol). Po míchání po 1,5 h při teplotě okolí se reakční směs neutralizuje kationtovou iontovýměnnou pryskyřicí Dowex 50W-X8 (cca 150 g suché pyridiniové H⁺formy, 1,6 mekv./g). Jakmile je pH neutrální (cca 10 min.), pryskyřice se zfiltruje, promyje se důkladně CH₂Cl₂ a MeOH a surový produkt se koncentruje ve vakuu. Zbytek se opětovně rozpustí v EtOAc (500 ml) a extrahuje se nasyceným vodným NaHCO₃ (2 x 250 ml), H₂O (250 ml) a nasyceným vodným NaCl (250 ml). Po usušení nad Na₂SO₄ a filtraci se rozpouštědla odstraní ve vakuu a výsledná pěna se opětovně rozpustí v 95:5 CH₂Cl₂/MeOH (300 ml). Tento roztok se pomalu přidává do rychle míchané směsi 1:1 Et₂O/hexanu (1250 ml) k vysrážení čistého 3'-(trityl)amino-3'-deoxythymidinu, **3t**, v 90% výtěžku (21,2 g, 43,8 mmol). Konverze na fosforamiditové monomery a/nebo sukcinylovaný nukleosid je popsána v příkladech 5-7 dále.

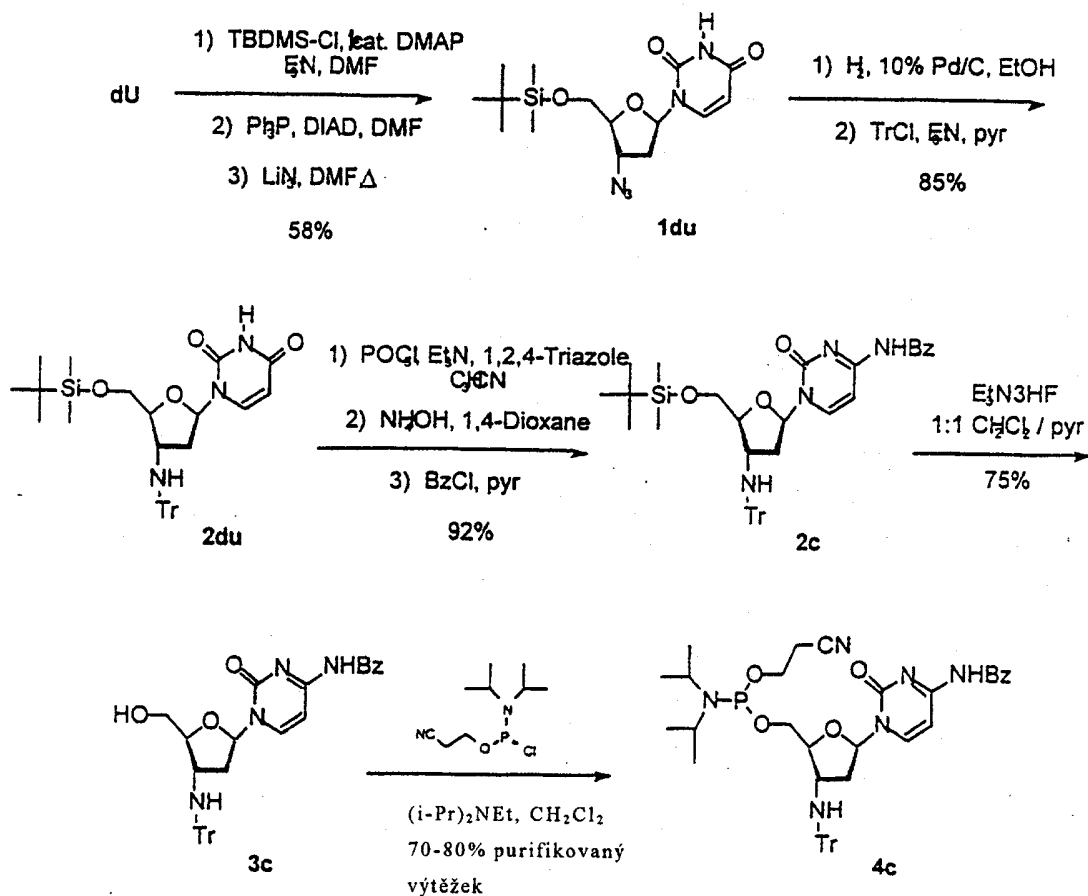


Příklad 2

Příprava 2'-deoxy-3'-tritylamino-2',3'-dideoxycytidin-5'-fosforamiditových monomerů

Syntéza N^4 -benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxycytidin-5'-(2-kyanoethyl *N,N*-diisopropyl)fosforamiditu, **4c**, je uvedena ve schematu II.

Schema II



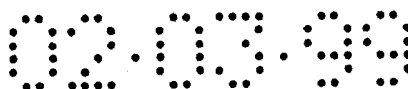
3'-azido-5'-O-(terc. butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxyuridin, **1du**. 2'-Deoxyuridin (11,4 g, 50 mmol) se důkladně usuší společným odpařováním ve vakuu s bezvodým DMF (2 x 100 ml). Potom se přidá DMF (100 ml),



následovaný triethylaminem (8,36 ml, 60 mmol), 4-dimethylaminopyridinem (0,31 g, 2,5 mmol) a terc.butyl(dimethylsilyl)chloridem (8,29 g, 55,0 mmol). Reakční směs se míchá po 1 h při teplotě místnosti, zředí se dichlormethanem (600 ml) a extrahuje se H₂O (3 x 200 ml) a nasyceným vodným NaCl (200 ml). Organická vrstva se suší nad Na₂SO₄, zfiltruje se a koncentruje ve vakuu. Výsledný zbytek se purifikuje na sílice (2-10% MeOH/CH₂Cl₂) za vzniku 80% výtěžku (13,7 g, 40,0 mmol) 5'-O-(terc.butyl(dimethylsilyl))-2'-deoxyuridinu. Přidají se trifenyfosfin (16,8 g,

64,0 mmol) a DMF (100 ml), a do míchané směsi se přidá roztok diisopropylazodikarboxylátu (12,6 ml, 64,0 mmol) v DMF (20 ml). Po míchání 2 h při teplotě místnosti se reakční směs koncentruje ve vakuu na asi 30 ml a nalije se do Et₂O (1200 ml). Požadovaný 2,3'-anhydro-5'-O-(terc.butyl(dimethylsilyl))-2'-deoxyuridin začíná s vysrážením po 10 min rychlého míchání. Získaná směs se uloží přes noc do lednice, sraženina se spojí filtrací, promyje se dalším chladným Et₂O (2 x 300 ml) a suší se ve vakuu za získání 90% výtěžku (11,7 g, 36,0 mmol) 2,3'-anhydro-5'-O-(terc.butyl(dimethylsilyl))-2'-deoxyuridinu jako bílé pevné látky, která se dále nepurifikuje. 2,3'-Anhydro-5'-O-(terc.butyl(dimethylsilyl))-2'-deoxyuridin (33,8 g, 104,2 mmol) potom reaguje s LiN₃ (7,65 g, 156,3 mmol) v DMF (300 ml) při 95-100 °C po 48 h. Získaná hnědá homogenní směs se potom ochladí na teplotu místnosti, koncentruje se ve vakuu na olej, rozpustí se v EtOAc (800 ml) a extrahuje se H₂O (200 ml). Vodná vrstva se extrahuje dvojnásobně s EtOAc (75 ml) a spojené organické vrstvy se promyjí H₂O (3 x 250 ml) a jednou nasyceným vodným NaCl (250 ml). Roztok EtOAc se suší nad Na₂SO₄, zfiltruje se a koncentruje ve vakuu za získání 87% výtěžku (33,2 g, 90,3 mmol) 3'-azido-5'-O-(terc.butyl(dimethylsilyl))-2',3'-dideoxyuridinu, **1du**, jako hnědavé pěny, která se odebírá přímo na hydrogenaci.

3'-(Trityl)amino-5'-O-(terc.butyl(dimethylsilyl))-2',3'-dideoxyuridin, **2du**. Surový **1du** (33,2 g, 90,3 mmol) se rozpustí ve 2:1 EtOH/CH₂Cl₂ (300 ml) a redukuje se hydrogenací (60 psi H₂, tedy kolem 413 kPa) za přítomnosti 10%



Pd/C (3,0 g) po 18 hodin. Následným odebráním katalyzátoru filtrací a odpařením rozpouštědla ve vakuu se získá kvantitativní výtěžek (30,4 g, 89,8 mmol) odpovídajícího 3'-aminu, který se odebírám přímo do další reakce. 5'-O-(terc.butylidimethylsilyl)-3'-amino-2',3'-dideoxyuridin (30,4 g, 89,8 mmol) se azeotropicky oddělí z pyridinu (2 x 300 ml) a rozpustí se ve směsi CH₂Cl₂ (600 ml) a bezvodém pyridinu (70 ml). Do tohoto roztoku se přidá triethylamin (25,0 ml, 179,6 mmol) a tritylchlorid (35,0 g, 125,7 mmol), a reakční směs se míchá po 2 h při okolní teplotě. Rozpouštědla se odstraní ve vakuu a surový produkt se

purifikuje na silice (1 - 5 % MeOH/CH₂Cl₂) za získání 85% výtěžku (44,3 g, 75,9 mmol) 3'-(trityl)amino-5'-O-(terc.butylidimethylsilyl)-2',3'-dideoxyuridinu, **2du**.

N⁴-Benzoyl-3'-(trityl)amino-5'-O-(terc.butylidimethylsilyl)-2',3'-dideoxycytidin, **2c**. Triethylamin (22,5 ml, 161,1 mmol) se přidává po kapkách po dobu 10 min do míchané směsi 1,2,4-triazolu (11,1 g, 161,1 mmol) a oxychloridu fosforečného (3,5 ml, 37,1 mmol) v bezvodém acetonitrilu (125 ml) při 0 °C. Do této chladné míchané směsi se přidá **2du** (9,4 g, 16,1 mmol) jako roztok v acetonitrilu (50 ml). Tato směs se míchá při teplotě místnosti po 2 h, přidají se triethylamin (30 ml) a H₂O (10 ml) ke zchlazení reakce a podpoře disoluce, a rozpouštědla se odeberou ve vakuu. Výsledná hnědá pevná látka se opětovně rozpustí v CH₂Cl₂ (250 ml), extrahuje se nasyceným vodným NaHCO₃ (3 x 150 ml), nasyceným vodným NaCl, suší se nad Na₂SO₄, zfiltruje se a koncentruje ve vakuu za získání kvantitativního výtěžku (10,2 g, 16,1 mmol) 3'-(trityl)amino-5'-O-(terc.butylidimethylsilyl)-2',3'-dideoxy-4-(1,2,4-triazol-1-yl)uridinu jako naoranžovělé pevné látky. Surový materiál se rozpustí v 1,4-dioxanu (200 ml) a ochladí se, a přidá se koncentrovaný NH₄OH (50 ml). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po 4 h a koncentruje se ve vakuu za vzniku kvantitativního výtěžku (9,4 g, 16,1 mmol) 3'-(trityl)amino-5'-O-(terc.butylidimethylsilyl)-2',3'-dideoxycytidinu jako běžové pevné látky. Tento surový materiál se potom azeotropicky oddělí z bezvodého pyridinu (2 x 200 ml), opětovně se rozpustí v pyridinu (200 ml) a



do tohoto míchaného roztoku se přidá benzoylchlorid (2,2 ml, 19,3 mmol) při 0 °C. Reakční směs se potom míchá při teplotě místnosti po 16 h, intenzivně se ochladí na 0°C, chladí se H₂O (40 ml) a po míchání 5 min se přidá koncentrovaný amoniak (40 ml) a reakční směs se míchá po dalších 15 min při 0 °C. Rozpouštědla se odstraní ve vakuu, zbytek se opětovně rozpustí v CH₂Cl₂ (125 ml) a extrahuje se nasyceným vodným NaHCO₃ (3 x 75 ml), suší se nad Na₂SO₄, zfiltruje se a koncentruje ve vakuu. Surový materiál se purifikuje na sílice (1 - 5% MeOH/CH₂Cl₂) za získání 92% výtěžku (10,2 g, 14,8 mmol)

N⁴-benzoyl-3'-(trityl)amino-5'-O-(terc. butyldimethylsilyl)-2',3'-dideoxycytidinu, **2c**.

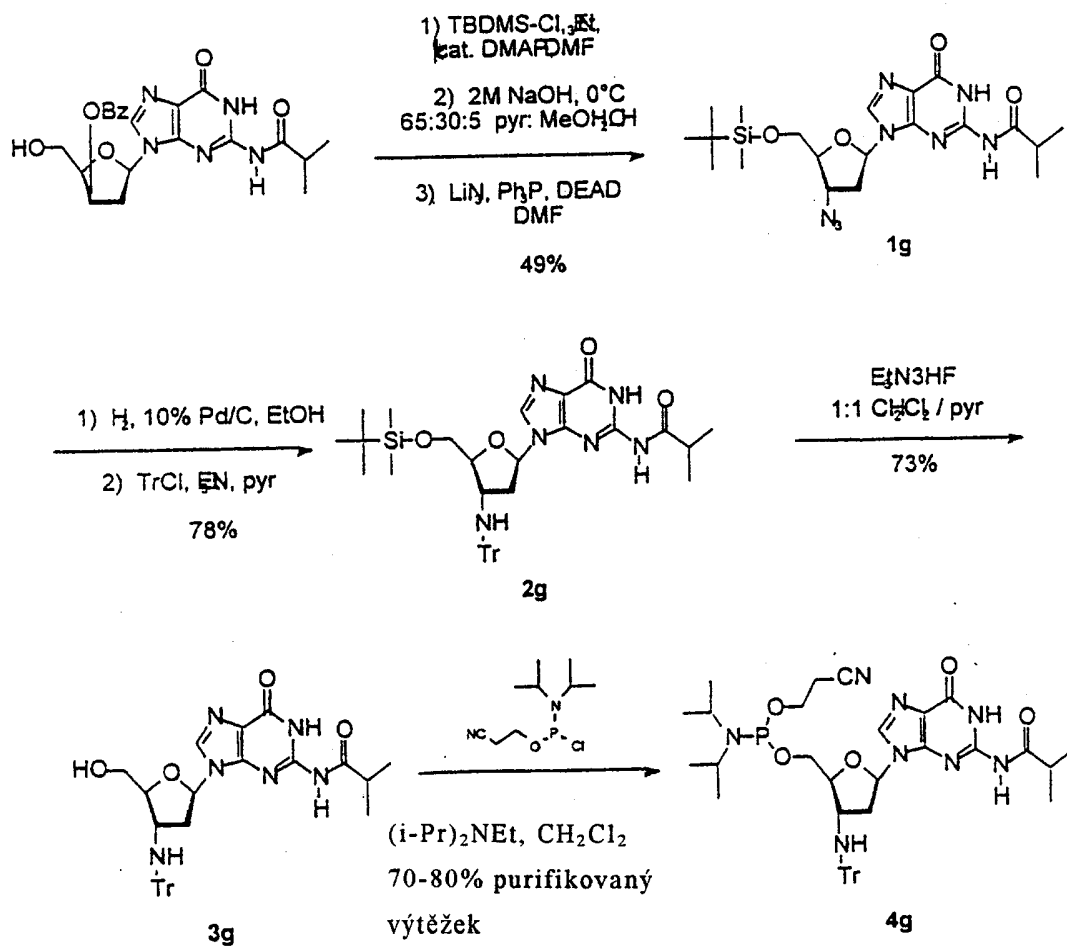
N⁴-Benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxycytidin, **3c**. 5'-TBDMS chránící skupina byla odebrána rozpuštěním **2c** (5,8 g, 8,5 mmol) v 1:1 CH₂Cl₂/pyridinu (25 ml) a reakcí s Et₃N 3HF (6,9 ml, 42,6 mmol) po 16 h. Reakční směs se zředí CH₂Cl₂ (200 ml) a extrahuje H₂O (2 x 50 ml) a nasyceným vodným NaCl (50 ml). Organická vrstva se suší nad Na₂SO₄, zfiltruje se a rozpouštědlo se odstraní ve vakuu. Surový produkt se purifikuje na sílice (3% MeOH/CH₂Cl₂) za získání 75% výtěžku (3,7 g, 6,4 mmol) N⁴-benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxycytidinu, **3c**. Konverze na fosforamiditové monomery a/nebo sukcinylovaný nukleosid je popsána v příkladech 5-7 dále.

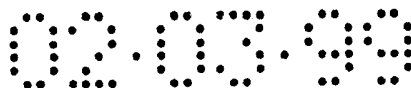
Příklad 3

Příprava 2'-deoxy-3'-tritylaminoguanosin-5'-fosforamiditových monomerů

Syntéza N²-isobutyryl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyguanosin-5'-(2-kyanoethyl *N,N*-diisopropyl)fosforamiditu, **4g** je uvedena ve schematu III. 5'-*O*-benzoyl-N²-isobutyryl-2'-deoxyguanosin a 3'-*O*-benzoyl-N²-isobutyryl-2'-deoxyxyloguanosin se připraví, jak bylo uvedeno dříve, Reese a kol., J.Chem. Soc.Perkin Trans.I, 1984:1263.

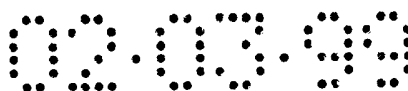
Schema III





5'-*O*-(*tert*.Butyldimethylsilyl)-*N*²-isobutyryl-3'-azido-2',3'-dideoxyguanosin, **1g**. Do míchaného roztoku 3'-*O*-benzoyl-*N*²-isobutyryl-2'-deoxyxyloguanosinu (4,86 g, 11,0 mmol) v DMF (20 ml) se přidá triethylamin (3,4 ml, 24,2 mmol), 4-dimethylaminopyridin (54 mg, 0,44 mmol) a *tert*.butyldimethylsilylchlorid (3,31 g, 22,0 mmol). Reakční směs se míchá po 2 h při teplotě místnosti, přidá se methanol (10 ml) a po míchání dalších 5 min se reakční směs koncentruje ve vakuu. Zbytek se opětovně rozpustí v CH₂Cl₂ (150 ml), promyje se H₂O (3 x 40 ml) a nasyceným

vodným NaCl (60 ml). Organická vrstva se suší nad Na₂SO₄, zfiltruje se a koncentruje ve vakuu za vzniku 6,40 g načervenalé zbarvené pěny. Do tohoto surového produktu se přidá předchlazený (asi 5 °C) roztok 2M NaOH v 65:30:5 pyridinu:MeOH:H₂O (44,0 ml, 87,9 mmol). Reakční směs se míchá v ledové lázni po 20 min a neutralizuje se 1 M HCl (97 ml) na pH 7. Reakční směs se koncentruje ve vakuu na asi 50 ml a extrahuje CH₂Cl₂ (3 x 75 ml). Spojené organické podíly se promyjí nasyceným vodným NaCl (50 ml), suší se nad Na₂SO₄, zfiltrují se a koncentrují ve vakuu za zisku 82% výtěžku (4,1 g, 9,1 mmol) 5'-*O*-(*tert*.butyldimethylsilyl)-*N*²-isobutyryl-2'-deoxyxyloguanosinu jako pískově zbarvené pěny, která se bere do další reakce bez další purifikace. Do surového 5'-*O*-(*tert*.butyldimethylsilyl)-*N*²-isobutyryl-2'-deoxyxyloguanosinu (47,3 g, 104,7 mmol) se přidá LiN₃ (15,4 g, 314,1 mmol), trifenylfosfin (41,2 g, 157,1 mmol) a bezvodý DMF (1000 ml). Diethylazodikarboxylat (24,7 ml, 157,1 mmol) se přidá a reakční směs se míchá po dobu 5 h při teplotě místnosti pod argonem. Přidá se H₂O (20 ml) a reakční směs se koncentruje ve vakuu. Zbytek se rozpustí v EtOAc (1500 ml), promyje se vodou (3 x 1000 ml), nasyceným vodným NaCl (1000 ml), suší se nad Na₂SO₄, zfiltruje se a koncentruje ve vakuu. Zbytek se purifikuje na sílice (1-5% MeOH/CH₂Cl₂), ačkoliv to umožní > 100% výtěžek (112,7 g) čistého 5'-*O*-(*tert*.butyldimethylsilyl)-*N*²-isobutyryl-3'-azido-2',3'-dideoxyguanosinu, **1g**. Tento znečištěný produkt není dále purifikován, a přímo se odebírá k hydrogenaci a purifikuje se jako 3'-amin.



5'-O-(*tert.* Butyldimethylsilyl)-N²-isobutyryl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyguanosin, **2g**. Surová sloučenina **1g** (49,9 g, 104,7 mmol) se rozpustí v (teplém) ethanolu (1600 ml) a hydrogenuje se (60 psi H₂, tedy kolem 413 kPa) za přítomnosti 10% Pd/C (2,5 kg) po 16 h při teplotě místnosti. Katalyzátor se odstraní filtrací a rozpouštědlo se odpaří ve vakuu za vzniku surového 5'-O-(*tert.* butyldimethylsilyl)-N²-isobutyryl-3'-amino-2',3'-dideoxyguanosinu, který se purifikuje na sílice (2-6% MeOH/CH₂Cl₂ a potom 1% Et₃N/6% MeOH/CH₂Cl₂) za vzniku 60% výtěžku (28,5 g, 63,2 mmol) čistého 5'-O-(*tert.* butyldimethylsilyl)-N²-isobutyryl-3'-amino-2',3'-dideoxyguanosinu jako ne zcela bílé pěny. 3'-Amin (28,5 g, 63,2 mmol) je

chráněn reakcí s triethylaminem (17,6 ml, 126,4 mmol) a tritylchloridem (28,2 g, 101,1 mmol) v pyridinu (500 ml) po 16 h při teplotě místnosti. Rozpouštědla se odstraní ve vakuu a zbytek se purifikuje na sílice (1-5% MeOH/CH₂Cl₂) za získu kvantitativního výtěžku (43,8 g, 63,2 mmol) 5'-O-(*tert.* butyldimethylsilyl)-N²-isobutyryl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyguanosinu, **2g**.

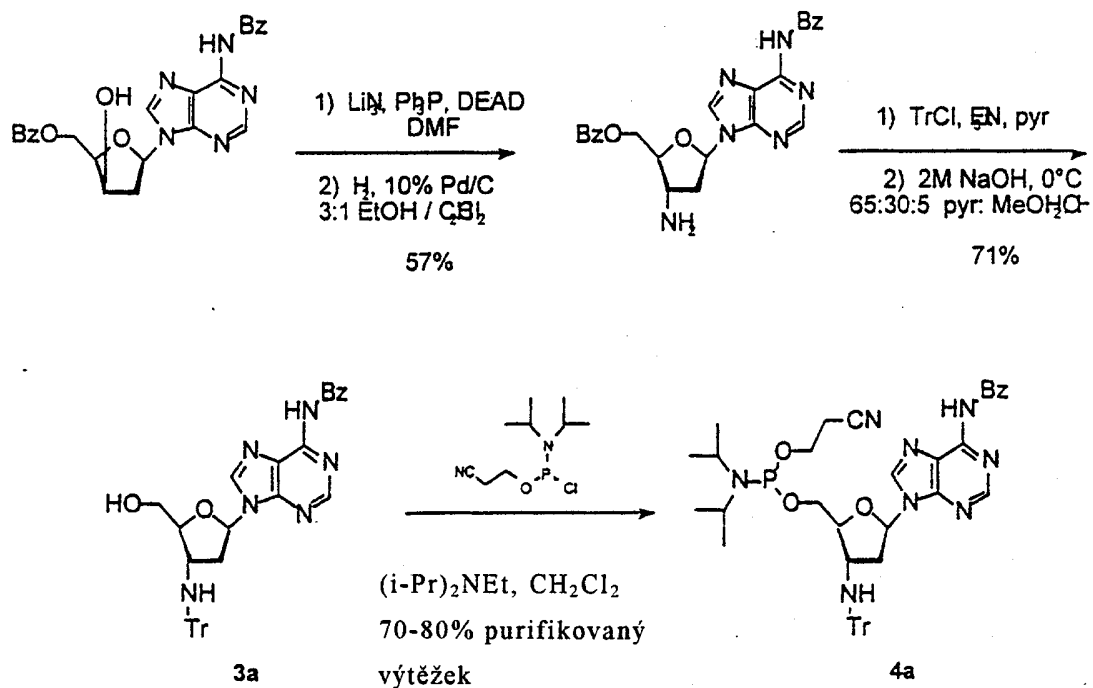
N²-Isobutyryl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyguanosin, **3g**. 5'-TBDMS chránící skupina se odstraní rozpuštěním **2g** (5,9 g, 8,5 mmol) v 1:1 CH₂Cl₂/pyridinu (25 ml) a reakcí s Et₃N 3HF (6,9 ml, 42,6 mmol) po 16 h. Reakční směs se zředí CH₂Cl₂ (200 ml) a extrahuje se H₂O (2 x 50 ml) a nasyceným vodným NaCl (50 ml). Organická vrstva se suší nad Na₂SO₄, zfiltruje se a rozpouštědlo se odpaří va vakuu. Surový produkt se purifikuje na sílice (2-5% MeOH/CH₂Cl₂) za vzniku 73% výtěžku (3,6 g, 6,2 mmol) N²-isobutyryl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyguanosinu, **3g**. Konverze na fosforamiditové monomery a/nebo sukcinylovaný nukleosid je popsána v příkladech 5-7 dále.

Příklad 4

Příprava 2'-deoxy-3'-tritylaminoadenosin-5'-fosforamiditových monomerů

Syntéza N⁶-benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyguanosin-5'-(2-kyanoethyl *N,N*-diisopropyl)fosforamiditu, 4a je uvedena ve schematu IV. N⁶-benzoyl-9-(5-0-benzoyl-2-deoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)adenin se syntetizuje postupem podle Herdewijna, J.Org.Chem., 53:5050 (1988).

Schema IV

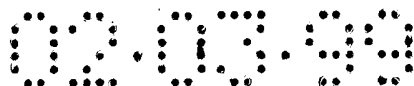




5'-O-(Benzoyl)-N⁶-benzoyl-3'-azido-2',3'-dideoxyadenosin, **1a**. N⁶-Benzoyl-9-(5-O-benzoyl-2-deoxy-β-D-threo-pentofuranosyl)adenin (7,0 g, 15,3 mmol), trifenylfosfin (6,0 g, 22,9 mmol) a LiN₃ (2,8 g, 56,4 mmol) se rozpustí v DMF (100 ml). Do této míchané směsi se přidá diethylazodikarboxylat (3,6 ml, 22,9 mmol) v jednom dílu, reakční směs se míchá 2,5 h při teplotě místnosti, a reakční směs se zchladí H₂O (10 ml). Rozpouštědla se odstraní ve vakuu, zbytkový olej se opětovně rozpustí v EtOAc (300 ml) a extrahuje H₂O (2 x 200 ml) a nasyceným vodným NaCl (200 ml). Organická vrstva se suší nad Na₂SO₄, zfiltruje se a koncentruje ve vakuu. Získaný zbytkový olej se purifikuje na SiO₂ (2-5% MeOH/CH₂Cl₂) za vzniku 5'-O-benzoyl-N⁶-benzoyl-3'-azido-2',3'-dideoxyadenosinu, **1a**, jako jantarově žluté pěny, která se odebírá přímo k hydrogenaci.

N⁶-Benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyadenosin, **3a**. Surový **1a** se rozpustí v 3:1 EtOH/CH₂Cl₂ (200 ml) a redukuje se hydrogenací (60

psi H₂, tedy kolem 413 kPa) za přítomnosti 10% Pd/C (0,7 g) po 18 h. Následným odstraněním katalyzátoru filtrací a odpařením rozpouštědla ve vakuu se získá 57% (4,0 g, 8,7 mmol) odpovídajícího 3'-aminu, který se odebírá přímo do další reakce. 5'-O-(Benzoyl)-N⁶-benzoyl-3'-amino-2',3'-dideoxyadenosin, (3,9 g, 8,5 mmol) se rozpustí v CH₂Cl₂ (50 ml), přidá se triethylamin (2,9 ml, 20,8 mmol), následovaný přídavkem tritylchloridu (2,9 g, 10,2 mmol). Po míchání po 1,5 h při teplotě místnosti se reakční směs zředí CH₂Cl₂ (50 ml) a extrahuje se H₂O (2 x 50 ml) a nasyceným vodným NaCl (50 ml). Organická vrstva se suší nad Na₂SO₄, zfiltruje se a koncentruje ve vakuu za vzniku surového 5'-O-benzoyl-N⁶-benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyadenosinu, který se odebírá přímo k hydrolyze 5'-benzoyl chránící skupiny. Surový 5'-O-benzoyl-N⁶-benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyadenosin, (asi 6,0 g, 8,5 mmol) se rozpustí v 1:1 THF/MeOH (100 ml) a ochladí se na 0 °C. Do této směsi se přidá předchlazený 2 M vodný NaOH (13,7 ml, 27,4 mmol) a reakční směs se míchá při 0 °C po 20 min. Po této době se zdá, že reakce proběhla pouze z 50 %, proto se přidá další 2M vodný NaOH (10,0 ml, 20 mmol). Po míchání dalších 15 min při 0 °C se reakční směs



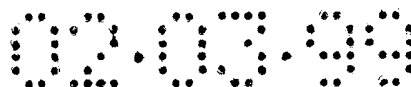
neutralizuje kationtově výměnou pryskyřicí Dowex 50W-X8 (asi 40 g formy H⁺ suchého pyridinium

1,6 mekv./g) na pH 6. Pryskyřice se zfiltruje a promyje se intenzivně MeOH a THF, a rozpouštědla se odstraní ve vakuu. Zbytek se opětovně rozpustí v CH₂Cl₂ (300 ml) a extrahuje se H₂O (150 ml), nasyceným vodným NaHCO₃ (2 x 150 ml), H₂O (150 ml) a nasyceným vodným NaCl (150 ml). Po usušení nad Na₂SO₄ se roztok zfiltruje a koncentruje ve vakuu. Zbytek se purifikuje na SiO₂ (2-3% MeOH/CH₂Cl₂) za zisku 71% výtěžku (3,6 g, 6,0 mmol) N⁶-benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyadenosinu, **3a**, jako bílé pěny. Konverze na fosforamiditové monomery a/nebo sukcinylovaný nukleosid je popsána v příkladech 5-7 dále.

Příklad 5

Příprava 3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxynukleosid-5'-(2'-kyanoethyl *N,N*-diisopropyl)fosforamiditů, **4a**, **4c**, **4g** a **4t**.

Do 8,4 mmol 3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxynukleosidu (**3a**, **3c**, **3g** nebo **3t**) (předtím dvakrát azeotropován z CH₃CN) ve 25 ml CH₂Cl₂ pod argonem se přidají 2,0 ml (11,8 mmol) *N,N*-diisopropylethylenaminu a 2,1 ml (9,4 mmol) 2-kyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorfosforamiditu. Po míchání 15 min se reakční směs zředí CH₂Cl₂ a extrahuje se nasyceným NaHCO₃ a nasyceným NaCl. Organická vrstva se suší (Na₂SO₄), zfiltruje se a koncentruje ve vakuu. N⁶-benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyadenosin-5'-(2-kyanoethyl *N,N*-diisopropyl)fosforamidit, **4a**, se purifikuje na SiO₂ (5% Et₃N/2% methanol/toluen), který poskytne 5,82 g (87,1 %) čistého fosforamiditu. ³¹P NMR (CD₃CN) δ 148,6, 149,2. N⁴-Benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxycytidin-5'-(2-kyanoethyl *N,N*-diisopropyl) fosforamidit, **4c**, se purifikuje na SiO₂ (3% MeOH/5%Et₃N/toluen) a poskytne 5,58 g (86,0%) čistého produktu. ³¹P NMR (CD₃CN) δ 149,3, 149,6. N²-Isobutyryl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyguanosin-5'-(2-kyanoethyl *N,N*-diisopropyl) fosforamidit, **4g**, se purifikuje pod argonem z 10 ml CH₂Cl₂ v rychle míchaném ethyletheru (200 ml) a hexanu (200 ml) při 4 °C k odstranění nečistoty



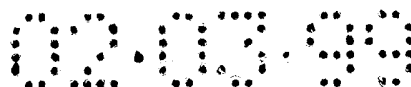
hydrogenfosfonamidatu, která v tomto případě nemůže být odstraněna chromatografií na koloně. Pevná látka se zfiltruje, promyje se hexanem a suší se ve vakuu. Srážení se opakuje a získaná pevná látka se dále purifikuje na SiO_2 (10% $\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) a poskytne 4,51 g (69%) čistého produktu fosforamiditu. ^{31}P NMR (CD_3CN) δ 148,7, 149,4. 3'-(Trityl)amino-2',3'-dideoxythymidin-5'-(2-kyanoethyl *N,N*-diisopropyl) fosforamidit, **4t**, se purifikuje na SiO_2 (2% $\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) a poskytne 4,06 g (70,7%) čistého fosforamiditu a některých směsných frakcí. ^{31}P NMR (CD_3CN) δ 149,4, 149,5.

Příklad 6

Příprava 3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxynukleosid-5'-(2'-kyanoethyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin)fosforamiditů, 5a, 5c, 5g a 5t.

Do 8,4 mmol 3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxynukleosidu (**3a**, **3c**, **3g** nebo **3t**) (předtím dvakrát azeotropován z CH_3CN) ve 25 ml CH_2Cl_2 pod argonem ochlazený na 4 °C se přidá 1,9 ml (12,6 mmol) DBU a 5,2 ml (8,4 mmol)

roztoku 2-kyanoethyl 2,2,6,6-tetramethylpiperidinchlorfosforamiditu v CH_2Cl_2 (konc. = 1,626 mmol/ml). Ledová lázeň se odstraní a roztok se míchá po 30-60 min. Aby se zabránilo rozkladu, vede se surový reakční produkt přímo na SiO_2 kolonu (3% MeOH/5% Et_3N /toluen pro **5a**, **5c** a **5t**, a 10% $\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ pro **5g**) pro purifikaci. Ve všech případech je další purifikace nezbytná, jak je uvedeno pro každý produkt. N^6 -benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyadenosin-5'-(2-kyanoethyl 2,2,6,6-tetramethylpiperidin) fosforamidit, **5a**, se purifikuje na SiO_2 (3% MeOH/5% Et_3N /toluen), který poskytne 5,21 g (74,3 % čistého fosforamiditu). ^{31}P NMR (CD_3CN) δ 164,8, 165,4. N^4 -benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxycytidin-5'-(2-kyanoethyl 2,2,6,6-tetramethylpiperidin) fosforamidit, **5c**, se purifikuje na SiO_2 (3% MeOH/5% Et_3N /toluen), který poskytne 5,07 g (74,2 % čistého produktu a některých směsných frakcí). ^{31}P NMR (CD_3CN) δ 164,8, 165,7. N^2 -Isobutyryl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyguanosin-5'-(2-kyanoethyl 2,2,6,6-tetramethylpiperidin) fosforamidit, **5g**, se vysráží ze 2 ml CH_2Cl_2 v rychle



míchaném ethyletheru (40 ml) a hexanu (40 ml) při 4 °C pod argonem k odstranění nečistoty hydrogenfosfonamidatu, která v tomto případě nemůže být odstraněna chromatografií na koloně. Pevná látka se zfiltruje, promyje se hexanem a suší se ve vakuu. Srážení se opakuje dvakrát a získaná pevná látka se dále purifikuje na SiO₂ (10% Et₃N/CH₂Cl₂) a poskytne 0,89 g (12,8%) čistého produktu fosforamiditu. ³¹P NMR (CD₃CN) δ 165,2, 165,5. 3'-(Trityl)amino-3'-deoxythymidin-5'-(2-kyanoethyl 2,2,6,6-tetramethylpiperidin) fosforamidit, **5t**, se purifikuje na SiO₂ (5% MeOH/5%Et₃N/toluen) a poskytne 3,33 g (54,8%) čistého fosforamiditu. ³¹P NMR (CDCl₃) δ 165,3, 166,1.

Příklad 7

Příprava 3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxynukleosid-5'-sukcinylátů, **6a**, **6c** a **6t**.

Do 1,5 mmol 3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxynukleosidu (**3t**, **3c**, nebo **3a**) v 5 ml CH₂Cl₂ se přidá 0,22 g (1,8 mmol) *N,N*-dimethylaminopyridinu a potom 0,18 g (1,8 mmol) sukcinanhydridu. Po míchání při teplotě místnosti 1 h se reakční směs zchladí přidávkem 0,6 ml methanolu, zředěného s CH₂Cl₂ a extrahuje se chladnou 10% kyselinou citronovou, vodou a nasyceným vodným NaCl. Organická vrstva se suší (Na₂SO₄), filtruje se a koncentruje na pěnu. N⁶-Benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxyadenosin-5'-sukcinylát, **6a**. Výtěžek 1,15 g (100%). N⁴-Benzoyl-3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxycytidin-5'-sukcinylát, **6c**. Výtěžek 0,77 g (76,3%). 3'-(Trityl)amino-3'-deoxythymidin-5'-sukcinylát, **6t**. Výtěžek 0,82 g (94,0%).

Příklad 8

Příprava 3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxynukleosid-5'-sukcinylem plněného CPG

Do 1 mmolu 3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxynukleosid-5'-sukcinylátu, (**6a**, **6c** nebo **6t**) a 0,13 g (0,95 mmol) 1-hydroxybenzotriazolu v 5 ml *N*-methylpyrrolidonu a 5 ml DMSO se přidá 0,35 ml (2,0 mmol) *N,N*-diisopropylethylaminu a potom 0,36 g (0,95 mmol) 2-(1-*H*-benzotriazol-1-yl)-



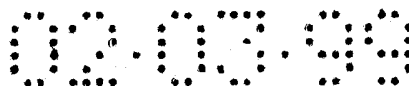
1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfatu. Roztok se míchá 5 min, přidá se do 10,0 g aminopropyl-CPG, a vloží se do třepačky na 6 h. CPG se filtruje a promyje se DMF, methanolem, a ethyletherem. Nezareagované aminoskupiny na CPG se acetylují použitím standardních ABI překrývacích roztoků po 30 min. Nanesení nukleosidu, stanovená trityl-testem při 432 nm ve 20% TFA/CHCl₃ použitím molárního koeficientu extinkce 40,7 $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, byly 38,6 $\mu\text{mol/g}$ pro A, 33,6 $\mu\text{mol/g}$ pro C a 29,0 $\mu\text{mol/g}$ pro T.

Příklad 9

Měření aktivační rovnovážné konstanty K_1 tetrazolu

Rovnováha definovaná rovnicí 1 byla studována rozpuštěním N⁶-benzoyl-3'-(trityl)amino-3'-deoxyadenosin-5'-(2-kyanoethyl N,N-diisopropyl)fosforamiditu, (4a. 56,1 mg, 65,2 μmol) v 0,300 ml suchého deuteroacetonitrilu a přidáním 0,300 ml roztoku 0,5 M tetrazolu v acetonitrilu, vše pod atmosferou argonu. Po 2 min bylo zaznamenáno ³¹P-NMR spektrum, zobrazené na obr. 1.

Spektrum sestává z rezonancí odpovídajících monomeru fosforamiditu (143,07, 143,72 ppm) tetrazolidyl-amiditového meziprojektu (127,58 ppm), hydrogenfosfonatu (10,24, 9,61 ppm) vzniklého z hydrolýzy některého z monomerů (přes meziprojekt tetrazolidyl amiditu), a minimálních vedlejších reakcí. Celek integrací těchto druhů byl posouzen jako shodný s výchozí koncentrací fosforamiditu 0,0993 M, koncentrace při rovnováze byly vypočteny z relativních integrací jednotlivých rezonancí. Koncentrace druhů, které neobsahují fosfor, a tudíž se nevykazují ve spektru, byly vypočteny následujícím postupem. Koncentrace diisopropylammonium tetrazolidu při rovnováze (0,0824 M) byla uvažována jako odpovídající výchozí koncentraci (0,0993 M) mínus rovnovážná koncentrace (0,0169 M) fosforamiditového monomeru. Koncentrace tetrazolu při rovnováze (0,0875 M) byla uvažována jako odpovídající výchozí koncentraci tetrazolu (0,2286 M) mínus součet koncentrace tetrazolidylamiditového meziprojektu (0,0587 M) a koncentrace



diisopropylamoniumtetrazolidu ((0,0824 M). Aktivační rovnovážná konstanta K_1 byla vypočtena následovně:

$$K_1 = \frac{[\text{Tetrazolidylamidit}] [\text{R}_2\text{NH}_2^+\text{tetrazolid}^-]}{[\text{Tetrazol}]^2 [\text{monomer amidit}]}$$

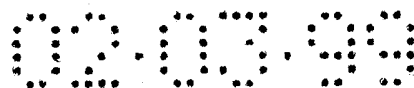
$$= \frac{(0,0587 \text{ M}) (0,0824 \text{ M})}{(0,0875 \text{ M})^2 (0,0169)}$$

$$= 37,4 \text{ M}^{-1}$$

Výše uvedený experiment se opakoval s použitím 3'-tritylaminothymidin-5'-diisopropylaminofosforamiditového monomeru (**4t**) a K_1 bylo stanoveno na $56,2 \text{ M}^{-1}$. Experiment se opět opakoval s použitím 3'-tritylaminothymidin-5'-tetramethylpiperidinylfosforamiditového monomeru (**5t**). ^{31}P -NMR spektrum je zobrazeno na obrázku 2.

Za podmínek experimentu nebyl při rovnováze detekován žádný zbývající tetramethylpiperidinylfosforamiditový monomer (předpokládáno 165,3, 166,1 ppm). Monomer může být detekovatelný nad hladinou spektra, pokud je jeho koncentrace alespoň 0,19 mM. Z této informace lze vypočítat, že K_1 musí být pro tuto rovnováhu alespoň 5260 M^{-1} , nebo 93 krát větší, než pro diisopropylaminofosforamiditový monomer. Experiment se opakoval ještě jednou s použitím 3'-tritylaminothymidin-5'-(N-isopropyl-N-t.butyl)fosforamiditového monomeru (**4t**). Jako v případě tetramethylpiperidinylfosforamiditového monomeru, nebyl tento monomer při rovnováze v ^{31}P -NMR spektru detekovaný.

Příklad 10



Syntéza monomerů oligo-2'-deoxynukleosid N3'→P5' fosforamidatů použitím diisopropylaminofosforamidatových monomerů v rozsahu 1-μmol

Oligonukleotid N3'→P5' fosforamidaty byly připraveny na ABI 392 DNA syntetizeru a v rozsahu 1-μmol a purifikovány preparativní intově výměnnou chromatografií. Syntéza se prováděla ve směru 5'ke 3'(namísto směru od 3'k 5', na který jsou naprogramovány komerčně dostupné syntetizery) použitím 1-μmolu 3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxynukleosid-5'-sukcinyly neseného GPC v koloně. 3'-Tritylamino-5'-diisopropylfosforamiditové monomery byly připraveny jako 0,1 M roztoky v acetonitrilu; aktivačním roztokem byl 0,5 M tetrazol v acetonitrilu (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), detritylačním roztokem byla 3% dichloroctová kyselina (DCA) v dichlormethanu (DMC), a oxidačním roztokem byl 0,1M jod v roztoku tetrahydrofuranu/pyridinu/vodě, 75/20/2, obj./obj./obj. (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

Oligonukleotid N3'→P5' fosforamidaty byly syntetizovány použitím repetitivního cyklu syntézy sestávajícího z detritylace následované interakcí, oxidací, interakcí, oxidací. Detritylace 3'-aminu na nosič vázaného nukleosidu bylo dosaženo použitím po 40 sekund toku 3% DCA/DCM pro nukleosidy G a A, a 50 sekund pro nukleosidy T a C. Na nosič navázaný 3'-

aminonukleosid byl potom šestkrát promyt proplachovací kombinací 10 sekund přívodu acetonitrilu / 5 sekund argonu. Interakce aminu s 5'-fosforamidit-3'-tritylaminonukleosidem bylo dosaženo použitím střídavého přívodu monomeru plus tetrazolu a tetrazolu samotného do kolony po asi 10 sekund, následovaný 5minutovým počkáním. Monomer byl vymyt z kolony argonem a bezprostředně byl přidán jodový roztok, následovaly 2 minuty sečkání. Po ukončení oxidace byl narůstající nosič, který váže oligomer, promyt jedenkrát 20 sekund kombinací přívodu acetonitrilu / 5 sekund přívodu argonu, a pětkrát kombinací 10 sekund přívodu acetonitrilu / 5 sekund přívodu argonu. Interakce a oxidace se jednou opakovaly, následovalo promývání před detritylací. Použitím tohoto postupu je použito asi 15 ekvivalentů monomeru (ve srovnání s původním nanesením nukleosidu vázaného na nosič) pro každý krok

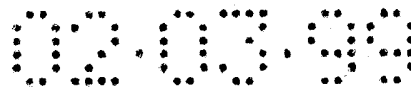


interakce; tudíž asi 30 ekvivalentů monomeru je použito pro každý cyklus syntézy.

Po ukončení syntézy byl 3'-detritylovaný oligonukleotid N3'→P5' fosforamidat vázaný na nosič odštěpen, a zbaven báze ochrany v koncentrovaném vodném amoniaku při 55 °C po 12 hodin. Roztok rozštěpeného a zbaveného chránící skupiny oligonukleotid N3'→P5' fosforamidatu byl odebrán z CPG a CPG byl promyt dvakrát 200 µl amoniakem. Všechny promývací roztoky amoniaku byly spojeny, roztok byl pufován na 0,01M NaOH a amoniak byl odstraněn ve vakuu. Po filtraci byl surový oligonukleotid purifikován na preparativní aniontové výměnné koloně (Pharmacia MonoQ 10/10), zbaven solí na Sephadexu G-25 (Pharmacia NAP-5) a lyofilizován.

Sekvence uvedené dále byly syntetizovány na ABI syntetizeru použitím buď fosforamiditového aminového výměnného postupu podle vynálezu, nebo řešením podle Atherton-Todd oxidační interakcí, jak je např. popsáno v Letsinger a kol., v patentu US 5 476 925. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3a a 3b a znázorněny na obr. 3a a 3b, na kterých jsou zobrazeny chromatogramy iontové výměnných HPLC separací dvou směsných bázeických sekvencí uvedených v tabulce.

Sekvence ¹	SEQ ID č.	Metoda	Surový x OD	HPLC = čistota	Výtěžek (OD jednotky)
T ₁₅	3	Amino-výměna	74	56%	41
T ₁₅	3	Atherton-Todd	49	29%	14
A ₁₅	4	Amino-výměna	101	39%	39
A ₁₅	4	Atherton-Todd	86	8%	7
5'-AACGAGTTGGGGCAT 5		Amino-výměna	96	42%	40



5'-TTCTCTCTCTA 6 Amino-výměna 71 62% 44

1

Sekvence syntetizované oxidační slučovací metodou podle Atherton-Todda mají 3'-terminální hydroxylovou skupinu, zatímco sekvence syntetizované metodou výměny aminu mají 3'-terminální aminoskupinu.

Příklad 11

Syntéza oligo-2'-deoxynukleosid N3'→P5 fosforamidatů použitím diisopropylaminofosforamiditových monomerů v rozsahu 1-μmolu : Srovnání slučování/oxidace se slučováním/oxidací/slučováním/oxidací

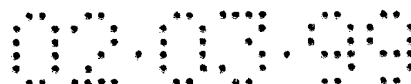
Vliv na výtěžek produktu jednoho kroku slučování /oxidace byl porovnáván s výtěžkem produktu při dvojitým kroku slučování /oxidace (slučování/oxidace/slučování/oxidace) následujícím způsobem:

Sekvence 5'- AAC-ATG-GAG-AGC-GTC-3' (SEQ ID NO:7) byla syntetizována použitím diisopropylaminofosforamiditových monomerů použitím postupu popsaného výše a porovnána s druhou syntézou, která byla podobná té výše, ale s následujícími rozdíly: 1) jedna slučování/oxidace použitá na cyklus (namísto dvou) a 2) koncentrace roztoku monomeru byla 0,2 M (namísto 0,1 M). Tudíž byly v experimentu jediného

slučování/oxidace použito kolem 30 ekvivalentů monomeru v každém cyklu syntézy, zatímco v experimentu slučování/oxidace/slučování/oxidace bylo použito kolem 15 ekvivalentů monomeru v každém ze dvou kroků slučování, pro totéž celkově kolem 30 ekvivalentů monomeru na cyklus syntézy.

Výsledky, které jsou uvedeny dále, dokládají zlepšenou účinnost při použití 2 x metody (slučování/oxidace)

Metoda	Surový OD	HPLC = čistota	Výtěžek (OD jednotky)
--------	--------------	-------------------	--------------------------



Slučování/oxidace	113	21,3%	24,1
2x(slučování/oxidace)	115	29,4%	33,8

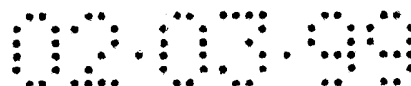
Příklad 12

Syntéza oligo-2'-deoxynukleosid N3'→P5' fosforamidatů v rozsahu 1-μmolu:
Porovnání bez překrytí, překrytí s acetanhydridem, a překrytí anhydridem
kyseliny isomáselné

Sekvence 5'- AAC-ATG-GAG-AGC-GTC-3' (SEQ ID NO:7) byla syntetizována třikrát v rozsahu 1-μmolu použitím výše uvedeného postupu, ale do dvou syntéz byl v každém cyklu po posledním oxidačním kroku a před detritylací vložen překrývací krok o 60 sekundách. Jako překrývací činidla byly použity acetanhydrid/NMI (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) v jednom z experimentů, a anhydrid kyseliny isomáselné (1/1/8 anhydrid kyseliny isomáselné/2,6-lutidin/THF)/NMI (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) ve druhém. Výsledky uvedené dále dokládají zlepšení výtěžku a čistoty s překrytím.

Překrytí	Surový OD	HPLC Čistota = Výtěžek (OD jednotky)	
Bez překrytí	97	29,6%	28,7
Acetanhydrid	97	39,6%	38,4
Anhydrid kyseliny isomáselné	82	39,6%	32,5

Příklad 13



Syntéza oligo-2'-deoxynukleosid N3'→P5' fosforamidatů v rozsahu 1-μmolu:
Porovnání oxidace I₂ a H₂O₂

Následující sekvence byly syntetizovány v rozsahu 1-μmolu použitím výše popsaného postupu, avšak v jedné řadě experimentů byla jodová oxidační reakční látka nahrazena oxidačním činidlem sestávajícím z 1,5% H₂O₂/3,5 % H₂O /20 % pyridinu/ 75 % THF. V těchto experimentech nebylo použito žádné překrytí.

Sekvence	Oxidační látky	%Plné délky produktu	%“N-1“chybných sekvencí
5'-TTTTT	I ₂	76,94	5,11
5'-TTTTT	H ₂ O ₂	80,05	2,55
5'-TAAAA	I ₂	73,05	4,28
5'-TAAA	H ₂ O ₂	78,72	2,69

Příklad 14

Syntéza oligo-2'-deoxynukleosid N3'→P5' fosforamidatů v rozsahu 10-μmolu :
Porovnání monomerů diisopropyl- a tetramethylpiperidinyl-fosforamiditu

Následující obecný postup byl prováděn pro syntézy v rozsahu 10-μmol:

Oligonukleotid N3'→P5' fosforamidaty byly připraveny na modifikovaném 390Z ABI DNA syntetizeru při rozsahu 10-μmol a



purifikovány preparativní iontově výměnnou chromatografií. 3'-Tritylamino 5'-fosforamidatové monomery byly připraveny jako 0,1 M roztoky v acetonitrilu; aktivátorem byl 0,15 M tetrazol v acetonitrilu; detritylačním roztokem byla 3% kyselina dichloroctová (DCA) v dichlormethanu (DCM), a oxidačním roztokem byl 0,1 M jod v tetrahydrofuranu/pyridinu/vodě, 75/20/2 (obj./obj./obj.) (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

Oligonukleotidy byly syntetizovány použitím vsádkového repetitivního cyklu syntézy, který sestává z detritylace následované slučováním (interakcí) a oxidací. Individuální moduly byly popsány a sloučeny do formy kompletního cyklu syntézy. Přesněji, syntéza je prováděna ve směru 5' ke 3' použitím 10 μ mol 3'-(trityl)amino-2',3'-dideoxynukleosid-5'-sukcinylem zatíženého CPG. Detritylace 3'-aminu bylo dosaženo použitím opakovaného přítoku 3% DCA/DCM do hlavy reakční nádoby následovaného 3 sekundami víření a odtoku. Celková doba exponování kyselinou je přibližně 2 minuty. Potom byl 3'-aminonukleosid vázaný na nosič promyt 10 krát řadou střídavých promývacích roztoků ode dna reakční nádoby stejně jako od hlavy s vířením a odtokem. Sloučení získaného volného aminu (převážně jako dichloracetátové soli) s 3'-(trityl)aminonukleosid-5'-fosforamiditovým monomerem se provádělo použitím výchozí dávky monomeru v reakční nádobě a následným dávkováním tetrazolu. Slučovací směs potom byla vířena po dobu 5 minut. Po odtoku z reakční nádoby byl

bezprostředně dodán roztok jodu, a vířen po 2 minuty. Oxidační roztok byl sušen a nosič byl promyt 10 krát řadou střídavých acetonitrilových promývacích roztoků ode dna reakční nádoby stejně jako od hlavy za víření a odtoku.

Po ukončení syntézy byl oligonukleotid s 3'-odebranou chránicí skupinou odštěpen z nosiče a zbaven ochrany koncentrovaným vodným amoniakem při 55 °C po 12 hodin. Roztok se pufroval na 0,01 M NaOH a amoniak se odstranil ve vakuu. Po následné filtraci se surový roztok purifikoval na



preparativní aniontově výměnné koloně (Pharmacia MonoQ 10/10), byl zbaven soli a lyofilizován.

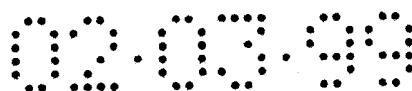
Použitím výše uvedeného postupu byly syntetizovány v rozsahu 10 μmol 5'-TT-3' dimery při použití různých koncentrací (a tedy různého počtu ekvivalentů) tetrazolu a buď monomeru diisopropylaminofosforamiditu nebo monomeru tetramethylpiperidinofosforamiditu. Výsledky jasně dokazují, že se syntézy fosforamidatu mohou provádět použitím výrazně nižších ekvivalentů silnějšího tetramethylpiperidinyl-fosforamiditového monomeru než méně silného diisopropylaminofosforamiditového monomeru.

Typ monomeru	Ekvivalenty monomeru	Ekvivalenty tetrazolu	%Dimeru	%Nezreagovaného monomeru
diisopropyl	10	50	93,8	2,4
diisopropyl	5	50	89,1	5,0
diisopropyl	2,8	28	87,1	8,0
diisopropyl	2,8	7	82,9	14,0
tetramethyl- piperidin	2,8	7	94,2	2,8

Příklad 15

Syntéza oligo-2'-deoxynukleosid N3'→P5' fosforamidatů v rozsahu 10- μmolu

Následující sekvence byly syntetizovány v rozsahu 10- μmol použitím výše uvedeného postupu a použitím následujících množství monomerů tetramethylpiperidinyl-fosforamiditu.



Sekvence	Ekvivalenty monomeru na cyklus	HPLC výtěžek (%)
5'-TT ¹	4	94,0
5'-AA ^{1,2}	4	98,1
5'-CC ^{1,2}	4	96,9
5'-CCC ²	4	93,2
5'-TTTTT	2,8	82,7

¹ Tento oligo byl odštěpen z nosiče s terminální tritylovou skupinou zbývající na dimeru.

² Tento HPLC výtěžek je korigován pro benzamid vytvořený při deprotekcí benzoylové chránící skupiny na bázi.

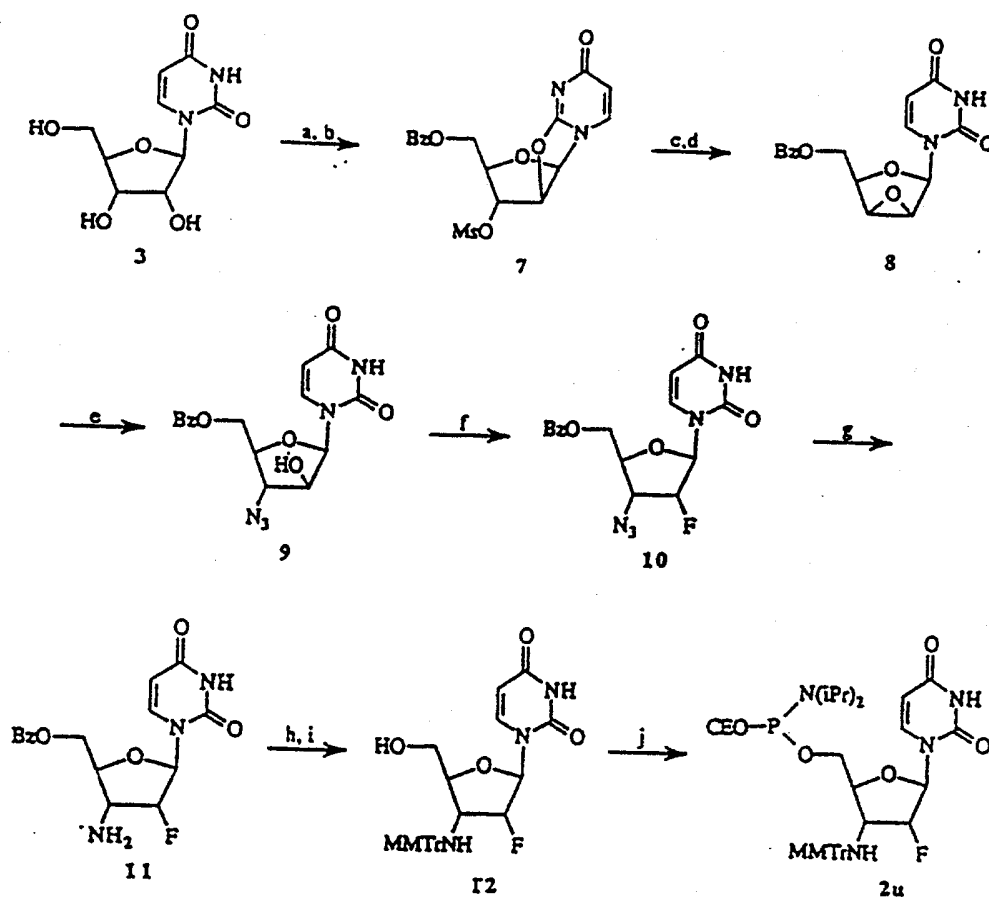
Příklad 16

N⁴-benzoyl-2'-fluor-3'-(4-methoxytrityl)amino-2',3'-dideoxyuridin 5'-(2-kyanoethyl N,N-diisopropyl)fosforamidit

2'-Fluornukleosid-fosforamiditové monomery podle vynálezu jsou připraveny postupem, znázorněným ve schématech V a VI. Stručně,

ribonukleosid se transformuje na 5'-hydroxyl-chráněný-2',3'-anhydroxynukleosid, potom se 2',3'-epoxykruh otevře zpracováním s azidem sodným nebo podobným reagens, za vzniku 5'-hydroxyl-chráněného-3'-azido-3'-deoxyarabinonukleosidu. Po purifikaci se 5'-hydroxyl-chráněný-3'-azido-3'-deoxyarabinonukleosid fluoruje na 2'-pozici zpracováním s diethylaminosulfurtrifluoridem (DAST), nebo podobným reagens, potom se azidoskupina redukuje za vzniku 3'-aminoskupiny. Po vhodném chránění 3'-aminoskupiny a uvolnění 5'-hydroxylové chránící skupiny je nukleosid fosfitylován na 5' kyslíku za tvorby surového fosforamiditového monomeru.

Schema V



- | | | |
|------------------------------|----------------------------|---|
| a) MsCl | e) NH_4N_3 | i) NaOH, H_2O |
| b) NaOBz | f) DAST | j) CEOP ($\text{N}(\text{iPr})_2$) ₂ |
| c) HCl, H_2O | g) H_2 .Pd/c | |
| d) NH_4OH | h) MMTriCl | |

V odkazu na schema V byl uridin 3 methansulfonován a potom selektivně benzylován za doprovázejícího vzniku 2,2'-anhydrocyklu zpracováním s benzoatem sodným podle postupů v literatuře, např. Codington, J.F.; Fecher, R.; Fox, J.J. *J. Am. Chem. Soc.* 1960, 82, 2794-2803. Výsledkem těchto reakcí je

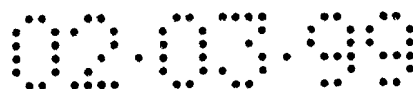


sloučenina **7** s celkovými výtěžky 69-77%. Jinou literární metodou (Codington, J.F.; Fecher, R.; Fox, J.J. *J. Organic Chem.* 1962, 27, 163-167), 2,3'-anhydroarabinonukleosid **7** byl transformován na 2',3'-anhydrolyxouridin **8** ve dvou krocích. To zahrnuje zpracování **7** s kyselinou chlorovodíkovou za vzniku 3'-mesyl-5'-benzoylarabinouridinu, který se během zpracování s hydroxidem amonným uzavře do formy lyxo-2',3'-epoxidu **8** v celkových výtěžcích 63-77%. Potom, také podle publikovaného postupu (Reichman, U.; Hollenberg, D.H.; Watanabe, K.A.; Fox, J.J. *J. Organic Chem.* 1976, 41, 2042-2043), byl 2',3'-anhydrolyxonukleosid **8** zahříván s azidem amonným. Oproti předpokladům v literatuře, není tato reakce zcela stereoselektivní, ale jejím produktem je chromatograficky nerozlišitelná směs požadovaného 5'-benzoyl-3'-azidoarabinonukleosidu **9** a jeho 2'-azido-2'-deoxyregioisomeru **9i** v poměru přibližně 2,5:1. Surový arabinonukleosid **9** byl fluorován DAST za vzniku 2'-fluor-3'-azidonukleosidu **10**, potom katalyticky hydrogenován za vzniku 2'-fluor-3'-aminonukleosidu **11**, který by oddělen od svého regioisomeru chromatografií na silikagelu. Ochrana 3'-aminu monomethoxytrityl (MMT) skupinou, následovaná 5'-debenzoylací, poskytla meziproduct **13**, který 5'-fosfitylací poskytuje požadovaný fosforamiditový stavební blok **2u** ve 22% celkovém výtěžku z anhydronukleosidu **8**. Ještě přesněji se kroky prováděly následujícím způsobem:

3'-O-Methansulfonyl-5'-O-benzoyl-2,2'-anhydroarabinouridin **7** byl připraven ve dvou krocích ze **3** postupem podle Codingtona *a kol.*, (citovaný výše, *J. Am. Chem. Soc.*) v 69-77% celkových výtěžcích.

3'-O-benzoyl-2,3'-anhydrolyxouridin **8** byl připraven ve dvou krocích ze **7** postupem podle Codingtona *a kol.*, (citovaný výše, *J. Am. Chem. Soc.*) v 63-77% celkových výtěžcích.

3'-azido-5'-O-benzoyl-3'-deoxyarabinouridin **9** byl připraven z **8** a bezvodého NH_4N_3 (popsaný v Obenland, C.O.; Mangold, D.J.; Marino, M.P. *Inorg. Synth.* 1966, 8, 53-56) postupem podle Reichmana *a kol.*, (citovaný výše), ale bez uspokojujivé rekrystalizace. Hmotové výtěžky byly 98% nebo vyšší, ale NMR svědčilo o 25-35% regioisomeru, 2'-azido-5'-O-benzoyl-2'-



deoxyxylouridinu, **9i**, který se eluuje společně s požadovaným produktem TLC na silikagelu.

^1H NMR, majoritní složka, **9**: δ 10,8 (br s, 1H), 8,11 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,68 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,62 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,5 (m, 2H), 6,19 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 5,40, (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 4,84 (m, 1H), 4,73 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 4,63 (br d, $J = 4,2$ Hz, 1H), 4,2 mm, 2H;

minoritní složka, **9i**: : δ 10,6 (br s, 1H), 8,11 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,81 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,64 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,5 (m, 2H), 5,85 (s, 1H), 5,47 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 4,86 (m, 1H), 4,76 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 4,62 (br d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 4,3-4,2 (mm, 2H).

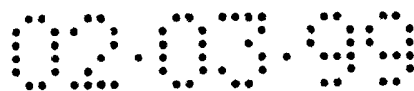
2'-fluor-3'-azido-5'-O-benzoyl-2',3'-dideoxyuridin **10** byl připraven následujícím postupem: Do 5 g (13,4 mmol) surového **9** (obsahujícího 25 % **9i**) ve 30 ml bezvodého CH_2Cl_2 se přidalo 8,8 ml (66,6 mmol) diethylaminosulfurtrifluoridu. Po míchání 48 h byla směs zředěna 100 ml CH_2Cl_2 a nalita do 200 ml nasyceného vodného NaHCO_3 . Když vývin plynu ustal, byla vrstva CH_2Cl_2 promyta 100 ml čerstvého roztoku NaHCO_3 a potom vodou (2 x 100 ml). Koncentrací CH_2Cl_2 vrstvy ve vakuu a mžikovou chromatografií se získalo 3,5 g (70%) produktu obsahujícího 20% rozsáhle chromatograficky nerozdělitelných isomerních nečistot, **10i**.

^1H NMR, majoritní složka, **9**: δ 8,7 (br s, 1H), 8,07 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,62 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,49 (dd, $J = 7,6, 7,6$ Hz, 2H), 7,39 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 5,70, (d, $J = 21,1$ Hz, 1H), 5,65 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 5,48 (dd, $J = 4,7, 52,9$ Hz, 1H), 4,7-4,4 (nerozděleno), 4,32 (dd, $J = 4,7, 9,5$ Hz, 1H),

4,27 (dd, $J = 4,7, 9,5$ Hz, 1H);

minoritní složka, **10i**: : δ 8,7 (br s, 1H), 8,03 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 7,64 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,51 (dd, $J = 7,4, 7,7$ Hz, 2H), 7,33 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 5,99 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H), 5,67 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 5,40 (ddd, $J = 2,8, 5,0, 53,4$ Hz, 1H), 4,8-4,4 (nerozděleno), 4,10 (mm, 2H).

2'-fluor-3'-amino-5'-O-benzoyl-2',3'-dideoxyuridin **11** byl připraven následujícím postupem: Do 3,5 g (9,3 mmol) surového **10** (10 % **10i**) ve 200



ml 95% ethanolu se přidalo 600 mg 10% paladia na uhlíku. Suspenze byla hydrogenována při 40 psi (kolem 413 kPa) přes noc a potom byl katalyzátor odstraněn filtrací. Rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu za vzniku 2,93 g (90%) světle žluté pevné látky sestávající ze dvou sloučenin, které byly rozdělitelné TLC. Mžikovou chromatografií se získalo 1,96 g (60% výtěžek) požadovaného produktu jako čisté bílé pevné látky. Hmotovou spektrometrií, FAB⁺, M+H⁺, bylo vypočteno: 350,1152, pozorováno 350,1152.

¹H NMR δ 8,14 (br s, 1H), 8,06 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 7,64 (dd, J = 7,4, 7,7 Hz, 1H), 7,57 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,50, (dd 7,7, 7,8 Hz, 1H), 5,86 (d, J = 18,5 Hz, 1H), 5,51 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 5,00 (dd, J = 4,3, 52,4 Hz, 1H), 4,81 (dd J = 2,2, 12,8 Hz, 1H), 4,73 (dd, J = 3,5, 12,7 Hz, 1H), 4,14 (ddd, J = 2, 3, 10,2 Hz, 1H), 3,57 (ddd, J = 4, 10,5, 26,6 Hz, 1H); ¹⁹F NMR δ-198,3 (ddd, J = 18,5, 26,4, 52,2 Hz).

2'-fluor-3'-(4-methoxytrityl)amino-2',3'-dideoxyuridin 12 byl připraven následujícím postupem: Do 1,0 g (2,9 mmol) 11 v 50 ml bezvodého pyridinu byl přidán 1,0 g (3,2 mmol) 4-methoxytritylchloridu. Směs byla míchána přes noc, přidalo se 5 ml nasyceného vodného NaHCO₃ a směs se koncentrovala ve vakuu na olej. Olej byl rozpuštěn ve 125 ml ethylacetátu, který byl promyt vodou (3 x 100 ml), a opětovně koncentrován ve vakuu na 2,05 g pěny.

Pěna byla rozpuštěna ve směsi 40 ml methanolu, 40 ml dioxanu a 10

ml vody. Byl přidán NaOH (1 g, 25 mmol) a směs byla míchána přes noc. Roztok byl koncentrován ve vakuu na sirup, který byl rozpuštěn ve 100 ml ethylacetátu a promyt vodou (3 x 100 ml). Koncentrací organické vrstvy ve vakuu se získalo 1,11 g pěny, která poskytla po mžikové chromatografií 1,05 g (76%) bílé látky. Hmotovou spektrometrií, FAB⁺, M+H⁺, bylo vypočteno: 518,2091, pozorováno 518,2076.

¹H NMR δ 8,64 (br d J = 4,2 Hz, 1H), 8,14 (br, s, 1H), 7,57 (mm, 5H), 7,48 (d J = 8,7 Hz, 1H), 7,3 (mm, 8H), 6,83 (d J 8,8 Hz, 2H), 5,67 (d, J = 17,7 Hz, 1H), 5,62 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 4,23 (m, 2H), 4,03 (br d, J = 10,2 Hz, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,31 (dddd, J = 3,6, 10,3, 10,9, 25,8 Hz, 1H), 2,80 (dd, J = 3,6, 50,9



Hz, 1H), 2,51 (dd, $J = 3,0, 11,2$ Hz, 1H); ^{19}F NMR δ -192,5 (dddd, $J = 2,9, 11,2$ Hz, 1H); ^{19}F NMR δ -192,5 (dddd, $J = 2,9, 17,7, 26,1, 50,9$ Hz).

N^4 -benzoyl-2'-fluor-3'-(4-methoxytrityl)amino-2',3'-dideoxyuridin 5'-(2-kyanoethyl N,N-diisopropyl)fosforamidit **2u** byl připraven následujícím postupem: Do 700 mg (1,35 mmol) **12** ve 20 ml bezvodého CH_2Cl_2 bylo přidáno 200 mg (1,17 mmol) tetrazolidu diisopropylamonného a 0,5 ml (1,57 mmol) 2-kyanoethyl N,N,N',N'-tetraisopropylfosfordiamiditu. Po míchání směsi po 3 h bylo rozpouštědlo odstraněno ve vakuu a zbytek byl purifikován na Chromatotronu s použitím 4 mm destiček a promýváním 0-3% methanolem, 0,5% triethylaminem v CH_2Cl_2 . Produkt byl koncentrován ve vakuu na olej, který byl rozpuštěn v 10 ml CH_2Cl_2 a vysrážen pomalým přidáváním do 100 ml rychle míchaného hexanu. Po dekantaci supernatantu byl produkt vakuově vysušen nad P_2O_5 za vzniku 680 mg (70%) bílého prášku.

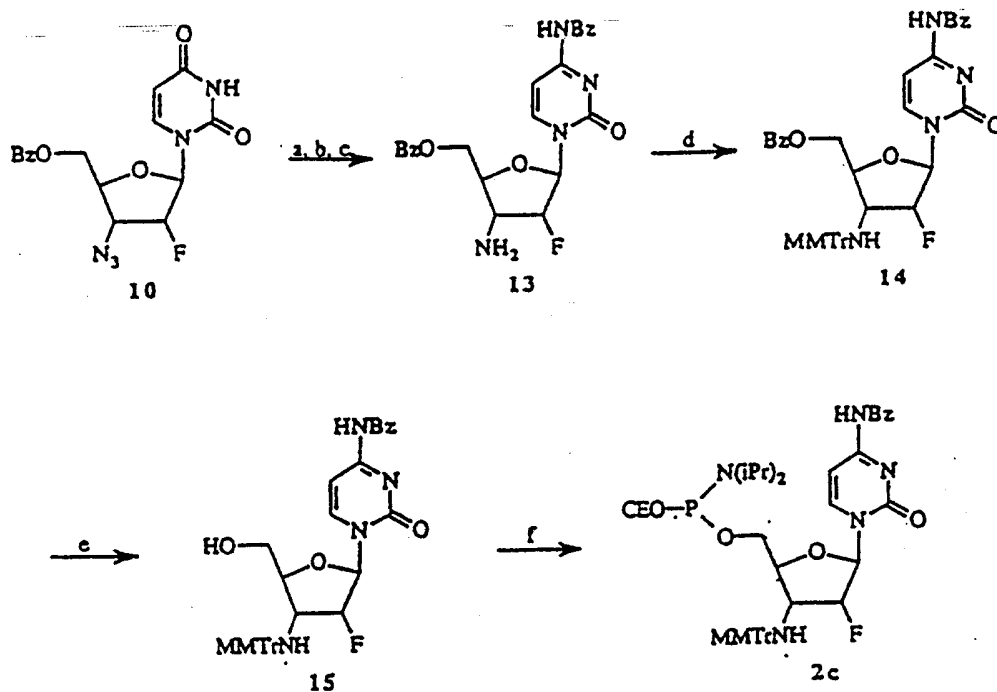
Hmotovou spektrometrií, FAB^+ , $\text{M}+\text{H}^+$, bylo vypočteno: 718,3170, pozorováno 718,3194. ^{19}F NMR δ -190,9 (ddd, $J = 21,7, 21,8, 51,3$ Hz); ^{31}P NMR δ 150,5, 149,5.

Příklad 17

N^4 -benzoyl-2'-fluor-3'-(4-methoxytrityl)amino-2',3'-dideoxycytidin 5'-(2-kyanoethyl N,N-diisopropyl)fosforamidit

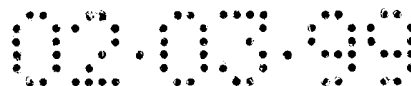
Pro přípravu příslušně chráněného cytidin-fosforamiditu **2c**, jak je znázorněno ve schematu VI dále, byl použit surový meziprodukt **10**. Uracilová báze byla konvertována na cytosin přizpůsobením postupu od Divakar a Reese, *J. Chem.Soc., Perkin.Trans.1* **1982**, 1171-1176. Následnou 4-N benzoylací a redukcí 3'-azidoskupiny na aminovou skupinu vznikla sloučenina **13**, oddělitelná od svého regioisomeru chromatografií na silikagelu. Ochrana 3'-aminu prostřednictvím MMT-skupiny, následovaná selektivní 5'-O-debenzoylací, poskytla meziprodukt **15**. Následná 5'-fosfitylace vedla k požadovanému fosforamiditu **2c** v 10% celkovém výtěžku vztaženo na anhydronukleosid **8**.

Schema VI



- a) POCl_3 , triazol, TEA; NH_4OH
- b) BzCl
- c) H_2 , Pd/C
- d) MMTrCl
- e) NaOH , Pyr/MeOH/ H_2O ; H^+ -Pyr dowex
- f) CEOP ($\text{N}(\text{iPr})_2$)

Ještě přesněji se kroky prováděly následujícím způsobem: $\text{N}^4,5'$ -O-dibenzoyl-2'-fluor-3'-amino-2',3'-dideoxycytidin 13 byl připraven následujícím postupem: Do 6,9 g (18,4 mmol) surového 10 (obsahujícího 35% 10i) v 50 ml bezvodého CH_3CN byl vnesen ledově chladný roztok 11,7 g (169 mmol) 1,2,4-



triazolu a 3,35 ml (36,1 mmol) POCl_3 v 90 ml bezvodého CH_3CN . Směs byla ochlazená v ledové lázni a byl přidán bezvodý triethylamin (23 ml, 165 mmol), potom byla reakční směs ponechána ohřát se za míchání na teplotu místnosti. Po 90 min bylo přidáno 15 ml (108 mmol) triethylaminu a 4 ml vody a směs byla míchána po 10 min. Rozpouštědlo bylo odebráno ve vakuu, potom bylo přidáno 250 ml ethylacetátu a roztok byl indikován TLC fluorescenčním meziproduktem se stejnou mobilitou, jako výchozí materiál.

Směs byla koncentrována ve vakuu na 6,7 g pěny. Byl přidán dioxan (100 ml) a 20 ml koncentrovaného vodného amoniaku, a po 3 h byla směs konvertována ve vakuu na žlutý gel. Gel byl rozpuštěn ve 100 ml ethylacetátu a promyt vodou (3x200 ml). Koncentrací ve vakuu a vakuovým vysušením nad P_2O_5 se získalo 5,4 g pevné látky, která poskytla pouze jednu skvrnu při TLC na slikagelu. Při ^{19}F NMR byly pozorovány pouze dva významné signály. Majoritní složka: δ -192,8 (ddd, $J = 22,8, 22,8, 53,1$ Hz); Minoritní složka: δ -200,7 (ddd, $J = 13,6, 19,9, 53,4$ Hz).

Byl přidán bezvodý pyridin (100 ml) a roztok byl ochlazen na 4 °C. Za míchání byl přidán benzoylchlorid (11,7 ml, 100 ml) a směs byla ponechána se ohřát na teplotu místnosti. Po 2 h bylo přidáno 5 ml vody a rozpouštědlo bylo odebráno ve vakuu, čímž se získal hnědý olej, který byl rozpuštěn ve 200 ml ethylacetátu, promyt vodou (3 x 200 ml) a potom

opětovně koncentrován ve vakuu za vzniku olejové pěny.

Byl přidán ethanol (150 ml) a 2 g 10% paladia na aktivním uhlí a směs byla přes noc hydrogenována při tlaku 40 psi H_2 (asi 413 kPa). TLC indikovala vytvoření dvou nových, pomalých, uzavřeně se pohybujících sloučenin.

Katalyzátor byl odebrán filtrací, a filtrát byl koncentrován ve vakuu na olejovou žlutou pěnu. Mžiková chromatografie na silikagelu (500 ml siliky, promývání 0-3% CH_3OH v CH_2Cl_2) poskytla 1,85 g částečně čistého produktu, který byl rozpuštěn v 10 ml CH_2Cl_2 . Pevná látka se rychle vysrážela, potom byla spojena filtrací a promyta čerstvým CH_2Cl_2 . Vakuovým vysušením se



získalo 1,5 g produktu **13** (11% výtěžek z **9** a **9i**) jako jemných bílých krystalů. Hmotovou spektrometrií, FAB⁺, M+H⁺, bylo vypočteno: 453,1574, pozorováno 453,1574.

¹H NMR δ 8,21 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 8,08-8,13 (mm, 3H), 7,94 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,46, 7,7 (mm, 8H), 6,04 (d, J = 16,9 Hz, 1H), 5,08 (dd, J = 3,6, 51,5 Hz, 1H), 4,85 (dd, J = 3,3, 12,8 Hz, 1H), 4,80 (dd, J = 2,1, 12,8 Hz, 1H), 4,26 (m, 1H), 3,48 (dm, J = 27 Hz, 1H), ¹⁹F NMR δ-200,1 (m).

N⁴,5'-O'-dibenzoyl-2'-fluor-3'-(4-methoxytrityl)amino-2',3'-dideoxycytidin **14** byl připraven následujícím postupem: Do 0,9 g (2,0 mmol) **13** ve 25 ml bezvodého pyridinu bylo přidáno 0,86 g (2,8 mmol) 4-methoxytritylchloridu, a směs byla míchána přes noc. Reakční směs byla ochlazená 0,5 ml H₂O a zkoncentrována ve vakuu. Byl přidán CH₂Cl₂ (50 ml) a promyto 50 ml nasyceného vodného NaHCO₃ a vodou (2 x 50 ml). Rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu, nahrazeno 10 ml CH₂Cl₂ a směs byla pipetována do 80 ml rychle míchaného 1/1 hexanu / etheru. Po dalším míchání 2 h se produkt spojil filtrací a sušil ve vakuu za vzniku 1,3 g (výtěžek 88%) produktu jako bílého prášku. Hmotovou spektrometrií, FAB⁺, M+H⁺, bylo vypočteno: 725,2772, pozorováno 725,2761.

¹H NMR δ 8,59 (br s, 1H), 8,07 (br d, J = 5,7 Hz, 1H), 7,89 (br d, J = 7 Hz, 2H), 7,83 (dd, J = 1,3, 6,7 Hz, 2H), 7,68 (dd, J = 7,4, 7,4 Hz, 2H),

7,5-7,6 (m, 8H), 7,43 (dd, J = 2,1, 6,9 Hz, 2H), 7,1-7,3 (mm, 7H), 6,71 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 5,80 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 5,03 (dd, J = 2,0, 13,0 Hz, 1H), 4,98 (dd, J = 2,3, 13,1 Hz, 1H), 4,41 (br d, J = 10,5 Hz, 1H), 3,63 (s, 3H), 3,36 (dddd, J = 3,1, 11,1, 11,1, 25,7 Hz, 1H), 2,84 (dd, J = 3,1, 59,9 Hz, 1H), 2,52 (dd, J = 2,7, 11,5 Hz, 1H); ¹⁹F NMR δ-196,3 (m).

N⁴-benzoyl-2'-fluor-3'-(4-methoxytrityl)amino-2',3'-dideoxycytidin **15** byl připraven následujícím postupem: Do 1,3 g (1,75 mmol) **14** ve 20 ml 65/30/5 pyridinu/methanolu/vody, chlazených v ledové lázni, bylo přidáno 10 ml chladného 2M NaOH v 65/30/5 pyridinu/methanolu/vodě. Směs byla míchána chladná po 20 min, potom se neutralizovala pyridinium-H⁺ formou Bio-

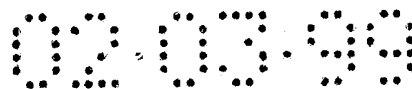
Rad AG^(R) 50W-X8 kationtově výměnnou pryskyřicí. Po 5 min byla pryskyřice odebrána filtrací a promyta methanolem. Spojené filtráty a promývací kapaliny byly koncentrovány ve vakuu na olej, který byl rozpuštěn v 100 ml ethylacetátu. Směs byla promyta 100 ml nasyceného vodného NaHCO₃ a vodou (2 x 100 ml). Po koncentrování ve vakuu na pěnu byl produkt rozpuštěn v 10 ml CH₂Cl₂ a pipetován do 75 ml rychle míchaného hexanu/etheru, 2/1. Produkt byl spojen filtrací a sušen ve vakuu za vzniku 1,13 g (102% výtěžek) produktu jako bílého prášku. Hmotovou spektrometrií, FAB⁺, M+Cs⁺, bylo vypočteno: 753,1489, pozorováno 753,1499.

¹H NMR δ 8,30 (br d, J= 6,8 Hz, 1H), 7,89 (br d, J = 6,7 Hz, 2H), 7,64 (dd, J = 7,4, 7,4 Hz, 1H), 7,44-7,56 (mm, 9H), 7,22-7,32 (mm, 9H), 6,82 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 5,80 (d, J=15,7 Hz, 1H), 4,26 (mm, 2H), 4,13 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,26 (dddd, J = 3,4, 10,7, 10,8, 26,5 Hz, 1H), 2,93 (dd, J = 3,3, 50,5 Hz, 1H), 2,50 (dd, J = 2,8, 11,0 Hz, 1H); ¹⁹F NMR δ-195,3 (m).

N⁴-benzoyl-2'-fluor-3'-(4-methoxytrityl)amino-2',3'-dideoxycytidin 5'-(2-kyanoethyl N,N-diisopropyl)fosforamidit **2c** byl připraven následujícím postupem Do 970 mg (1,56 mmol) 15 ve 25 ml bezvodého CH₂Cl₂ bylo přidáno 200 mg (1,17 mmol) diisopropylamoniumtetrazolidu a 1,0 ml (3,15 mmol) 2-kyanoethyl N,N,N',N'-tetrakisopropylfosfordiamiditu. Po míchání

směsi 3 h bylo rozpouštědlo odstraněno ve vakuu a zbytek byl purifikován na Chromatotronu použitím 4 mm desek a promýváním 0-1,5% methanolem v 0,5% triethylaminu v CH₂Cl₂. Produkt byl koncentrován ve vakuu na pěnu, která byla rozpuštěna v 10 ml CH₂Cl₂ a vysrážena pomalým přidáváním 40 ml rychle míchaného hexanu. Po dekantaci supernatantu byl produkt vakuově vysušen nad P₂O₅ za vzniku 880 mg (69%) bílého prášku. Hmotovou spektrometrií, FAB⁺, M+Cs⁺, bylo vypočteno: 953,2568, pozorováno 953,2531. ¹⁹F NMR δ-193,6 (m); ³¹P NMR δ 150,4, 149,4.

Příklad 18



N⁴-benzoyl-2'-fluor-3'-(4-methoxytrityl)amino-2',3'-dideoxycytidin 5'-sukcinylnesený CPG

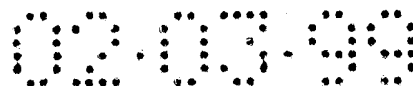
Meziprodukt **15** byl 5'-sukcinylován a nanesen na CPG pevný nosič standardními postupy, např. Atkinson, T; Smith, M. v *Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach*, Gait, M.J. Ed., IRL Press, 1984, 35-81; a Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Lett*, 1989, 30, 1927-1930, Přesněji byl N⁴-benzoyl-2'-fluor-3'-(4-methoxytrityl)amino-2',3'-dideoxycytidin 5'-sukcinylnesený CPG připraven následujícím postupem: Do 100 mg (0,16 mmol) **15** ve 2 ml bezvodého CH₂Cl₂ bylo přidáno 55 mg (0,55 mmol) sukcinanhydridu a 65 mg (0,53 mmol) dimethylaminopyridinu. Směs byla míchána po 2 h, odpařena ve vakuu na olej. Olej byl rozpuštěn ve 20 ml CH₂Cl₂, promyt 20 ml nasyceného vodného NaHCO₃ a vodou (2 x 20 ml), a potom opětovně koncentrován ve vakuu na pěnu. Do pěny byl přidán 1 ml 0,4 M diisopropylethylamin v DMSO/N-methylpyrrolidinu, 1/1, a 0,7 ml 0,2 M 1-hydroxybenzotriazolu, 0,2 M 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfátu v DMSO/N-methylpyrrolidinu, 1/1. Po 3 min byla směs vtažena do 10 ml injekční stříkačky obsahující 1,2 g CPG s dlouhými alkylaminořetězci. Do injekční stříkačky bylo rovněž nataženo dalších 5 ml promývací tekutiny DMSO. Směs CPG-nukleosid byla míchána po 1,5 h, potom byl CPG promyt 5 objemy bezvodého acetonitrilu.

Nezreagované aminoskupiny CPG byly acetylovány standardními překrývacími roztoky (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) po 2 min. CPG byl opět promyt 5 objemy acetonitrilu a 5 objemy CH₂Cl₂. Nanesení nukleosidu bylo stanoveno standardním tritylovým testem na přibližně 5 μmolu/g.

Příklad 19

Syntéza oligo-2'-fluornukleotid N3'→P5' fosforamidatů na pevné fázi

Oligo-2'-fluornukleotid N3'→P5' fosforamidaty byly syntetizovány na pevné fázi nosičů použitím monomerů fosforamiditů ze schemat V a VI. Sloučeniny **22-25** (Tabulka 1) byly syntetizovány cestou fosforamiditových



Sloučeniny 22-25 (Tabulka 1) byly syntetizovány cestou fosforamiditových monomerů. Průměrná účinnost slučování, jak je stanovena MMT-kationtovým testem, byla kolem 94% s jediným slučováním v cyklu a kolem 96% s dvojitou aplikací kroku 2 na cyklus syntézy. Reprezentativní IE HPLC profil syntézy surového oligomeru je znázorněn na obr. 4.

Jednotně modifikované oligo-2'-fluornukleotid N3'→P5' fosforamidaty byly připraveny přenosovou reakcí amiditu na ABI 380B syntetizeru použitím následujícího protokolu:

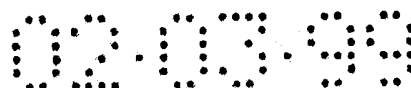
- 1) detrylace, 5% kyselina dichloroctová v dichlormethanu, 1 min,
- 2) slučování 0,1 M fosforamiditu 2a nebo 2c (schema V nebo VI) a 0,45 M tetrazolu v acetonitrilu, 3 min,
- 3) oxidace, 0,1 M jod v tetrahydrofuranu/pyridinu/vodě, 10/10/1, obj./obj./obj., 1 min,
- 4) překrytí, acetylace nezreagovaných 3'-aminoskupin standardními PE aplikovanými biosystemy (PE Applied Biosystems) (Foster City, CA) překrývacími roztoky, 30 s.

Po chemických krocích v cyklu následovala promývání acetonitrilem a proplach suchým argonem po 0,2-0,4 min. Po odštěpení z pevného nosiče a odebrání ochrany koncentrovaným vodním amoniakem, 1-1,5 h, 55°C, byly oligonukleotidy analyzovány a purifikovány IE HPLC. Oligonukleotidy byly odsoleny na Pharmacia NAP-5 nebo NAP-10 gelových filtračních kolonách

bezprostředně po purifikaci a uskladněny zmražené nebo lyofilizované při minus 18 °C.

Příprava 5'-fosforylovaných oligonukleotidů byla uskutečněna během sulfonem derivatizovaného CPG, např. Gryaznov, S.M.; Letsinger, R.L. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 1403-1408.

Pro IE analýzy a purifikaci oligonukleotidů byly použity systémy Dionex DX300 nebo DX 500. Kolona Pharmacia MonoQ 10/10 byla použita pro analýzu a purifikaci surových oligomerů, promývaná gradientem 2% za minutu 1,5 M NaCl v 10 mM NaOH. Kolona Dionex NuceloPac PA100, promývaná gradientem 1,5% za minutu 1,5 M NaCl v 10 mM NaOH byla použita pro



všechny ostatní IE HPLC analýzy. Pro RP HPLC byla použit Hewlett Packard Hypersil ODS, 5 μ kolona vodního HPLC systému, s gradientem 1% za minutu acetonitrilu v 0,1 M triethylamoniumacetatu, pH 7,0.

NMR spektra byla zaznamenávána na Bruker DRX-400 spektrometru. Chemické přesuny jsou zaznamenány ve vztahu k TMS, CCl₃F a H₃PO₄, resp. pro spektra ¹H, ¹⁹F a ³¹P.

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) se prováděly na Whatmannových silikagelových deskách se zadní polyesterovou stranou, promýváním s methanolem/dichlormethanem.

Kyselá hydrolyza 0,17 OD₂₆₀ dimeru dU^f_{np}T byla provedena ve 25 μ l 64% kyseliny octové, 2 h při 55 °C, a reakční směs byla analyzována RP HPLC. Přibližně 83% dimeru, retenční doba (Rt) 15,0 min, bylo hydrolyzováno na hlavně 5'-thymidylovou kyselinu, a 2'-fluor-3'-aminouridin, Rt 11,2 min, jako bylo identifikováno současným vstřikováním ověřenými standardy. Také bylo v reakční směsi nalezeno kolem 7,5% thymidinu, Rt 12,1 min.

Tabulka 1

Oligonukleotidy a hodnoty T_m jejich duplexů

Př.	Oligonukleotid ^a	č.	SEQ ID č	T _m °C ^b DNA ^c	T _m °C ^b RNA ^c
1	UUUUUUUUUT	18	8	16,7;24,6	17,9;20,3
2	U _{np} U _{np} U _{np} U _{np} U _{np} U _{np} U _{np} U _{np} U _{np} T	19	8	18,5;38,2	38,1;47,2
3	U _{np} U _{np} U _{np} U _{np} U ^f _{np} U _{np} U _{np} U _{np} U _{np} T	20	8	20,0;41,0	40,1;49,2
4	U _{np} U _{np} U _{np} U ^f _{np} U ^f _{np} U _{np} U _{np} U _{np} U _{np} T	21	8	23,4;44,6	44,5;52,7
5	_p U ^f _{np} U ^f _{np} U ^f _{np} U ^f _{np} U ^f _{np} U ^f _{np} U ^f _{np} U ^f _{np} U ^f _{np} U ^f _{np} U ^f _{np} T				

SEKVENČNÍ PROTOKOL**(1) OBECNÉ INFORMACE:**

(i) PŘIHLAŠOVATEL: Bernard. L. Hirschbein, Karen L. Fearon, Sergei M. Gryaznov, Sarah N. McCurdy, Jeffrey S. Nelson, Ronald G. Schultz

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Způsob syntézy oligonukleotid N3'→P5' fosforamidatů na pevné fázi

(iii) POČET SEKVENCÍ: 10

(iv) KORESPONDENČNÍ ADRESA:

(A) ADRESÁT: Stephen C. Macevicz, Lynx Therapeutics, Inc.

(B) ULICE: 3832 Bay Center Place

(C) MĚSTO: Hayward

(D) STÁT: Kalifornie

(E) ZEMĚ: USA

(F) ZIP: 94545

(v) POČÍTAČOVÁ ČTECÍ FORMA:

(A) TYP PROSTŘEDÍ: disketa 3,5 palců

(B) POČÍTAČ: IBM kompatibilní

(C) OPERAČNÍ SYSTÉM: Windows 3,1

(D) SOFTWARE: Microsoft Word for Windows 2,0

(vi) SOUČASNÁ DATA PŘIHLÁŠKY:

(A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY:

(B) DATUM PODÁNÍ:

(C) ZATRŽIDĚNÍ:

(vii) DATA PRIORITYNÍ PŘIHLÁŠKY:

(A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY: 08/603566

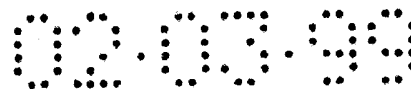
(B) DATUM PODÁNÍ: 21. února 1996

(viii) INFORMACE O ZÁSTUPCI:

(A) JMÉNO: Stephen C. Macevicz

(B) ČÍSLO REGISTRACE: 30,285

(C) REFERENCE/ČÍSLO: LYNX -035/01



(ix) TELEKOMUNIKAČNÍ INFORMACE:

(A) TELEFON: (510) 670-9365

(B) TELEFAX: (510) 670-9302

(2) Údaje k SEQ ID NO:1

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 17 nukleotidů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězová

(D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 1

GGCCAAAAG CCACTAT

17

(2) Údaje k SEQ ID NO:2

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 11 nukleotidů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězová

(D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 2

AAGCCTTTAT C

11

(2) Údaje k SEQ ID NO:3

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

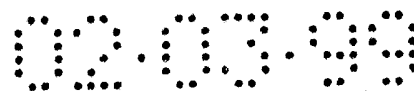
(A) DÉLKA: 15 nukleotidů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězová

(D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 3



TTTTTTTTTT TTTT 15

(2) Údaje k SEQ ID NO:4

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 15 nukleotidů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 4

AAAAAAAAAA AAAAA 15

(2) Údaje k SEQ ID NO:5

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 15 nukleotidů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 5

AACGAGTTGG GGCAT 15

(2) Údaje k SEQ ID NO:6

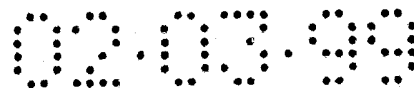
(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 11 nukleotidů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 6

TTCTCTCTCT A 11

(2) Údaje k SEQ ID NO:7



(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 15 nukleotidů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězová

(D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 7

AACATGGAGA GCGTC

15

(2) Údaje k SEQ ID NO:8

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 10 nukleotidů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězová

(D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 8

UUUUUUUUUT

10

(2) Údaje k SEQ ID NO:9

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 10 nukleotidů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězová

(D) TOPOLOGIE: lineární

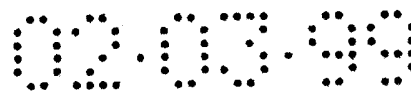
(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 9

UUUUUUUUUU

10

(2) Údaje k SEQ ID NO:10

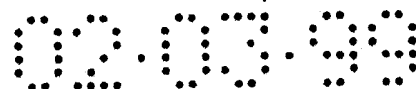
(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:



- (A) DÉLKA: 11 nukleotidů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

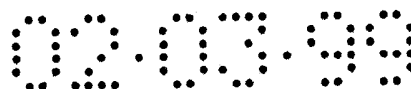
(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 10

CUUCUCCUU A



PATENTOVÉ NÁROKY

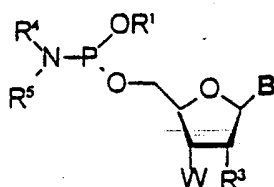
1. Způsob syntézy oligonukleotid N3'→P5' fosforamidatu v y z n a č u - j í c í s e t í m, že zahrnuje kroky:
 - (a) poskytnutí prvního nukleosidu vázaného na pevnou fázi nosiče, přičemž první nukleosid má chráněnou 3'-aminoskupinu;
 - (b) odebrání chránicí skupiny z chráněné 3'-aminoskupiny za vzniku volné 3'-aminoskupiny;
 - (c) reakci volné 3'-aminoskupiny s 3'-chráněným monomerm aminonukleosid-5'-fosforamiditem za vzniku internukleosid N3'→P5' fosforamiditové vazby; a
 - (d) oxidaci uvedené vazby.
2. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje krok vícenásobného opakování uvedených kroků reakce a oxidace.
3. Způsob podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená vícenásobnost je mezi 2 a 4, včetně.
4. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje krok opakování kroků (b) až (d), až je uvedený oligonukleotid N3'→P5' fosforamidat syntetizován.
5. Způsob podle nároku 4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený monomer 3'-chráněný aminonukleosid-5'-fosforamidit má tetrazolovou aktivační rovnovážnou konstantu alespoň 10 M⁻¹.
6. Způsob podle nároku 5 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje krok překrytí uvedených volných 3'aminoskupin, aby se zabránilo reakci s uvedeným monomerm 3'-chráněným aminonukleosid-5'-fosforamiditem.



7. Způsob podle nároku 6 vyznačující se tím, že uvedený monomer 3'-chráněný aminonukleosid-5'-fosforamidit má tetrazolovou aktivační rovnovážnou konstantu alespoň 100 M^{-1} .

8. Způsob podle nároku 7 vyznačující se tím, že uvedený monomer 3'-chráněný aminonukleosid-5'-fosforamidit má aminoskupinu fosforamiditu s pK_a alespoň 10.

9. Způsob podle nároku 8 vyznačující se tím, že monomer 3'-chráněný aminonukleosid-5'-fosforamidit je definovaný vzorcem:



kde

B je pyrimidin, purin, nebo jejich analog;

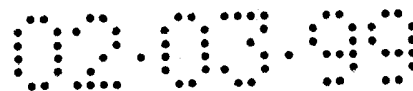
R^1 je fosfátová chránicí skupina;

W je buď $-\text{NHR}^2$ nebo $-\text{OR}^7$, kde R^2 je amino-chránicí skupina a kde R^7 je hydroxyl chránicí skupina;

R^3 je vodík, hydroxyl, fluor nebo $-\text{OR}'$, kde R' je alkyl s 1 až 3 atomy uhlíku nebo hydroxyl chránicí skupina; a

R^4 a R^5 dohromady s dusíkem, na který jsou navázány, tvoří alkylaminovou nebo arylaminovou odstupující skupinu, která má do 40 atomů vybraných ze skupiny sestávající z uhlíku, kyslíku, síry a dusíku.

10. Způsob podle nároku 9 vyznačující se tím, že R^3 je vodík, a že R^4 a R^5 samostatně jsou alkyl, aralkyl, cykloalkyl nebo cykloalkylalkyl mající celkově sloučených od 6 do 20 atomů uhlíku.



11. Způsob podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený krok reakce zahrnuje dále zpracování uvedeného monomeru 3'-chráněného

aminonukleosid-5'-fosforamiditu s nukleofilním katalyzátorem za vzniku reaktivního meziproduktu.

12. Způsob podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným nukleofilním katalyzátorem je tetrazolový aktivátor.

13. Způsob podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený krok oxidace dále zahrnuje zpracování uvedené vazby oxidačním činidlem vybraným ze skupiny sestávající z peroxidu vodíku a jodu.

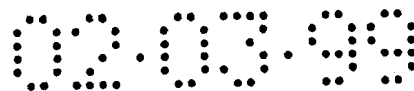
14. Způsob podle nároku 9 v y z n a č u j í c í s e t í m, že R^3 je vodík, a že R^4 a R^5 dohromady tvoří alkylenový řetězec obsahující do 12 atomů uhlíku v základním řetězci a celkově od 4 do 20 atomů uhlíku, kdy jsou obě terminální valenční vazby uvedeného řetězce navázány na atom dusíku, na nějž se váže R^4 a R^5 .

15. Způsob podle nároku 14 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený krok reakce dále zahrnuje zpracování uvedeného monomeru 3'-chráněného aminonukleosid-5'-fosforamiditu s nukleofilním katalyzátorem za vzniku reaktivního meziproduktu.

16. Způsob podle nároku 15 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným nukleofilním katalyzátorem je tetrazolový aktivátor.

17. Způsob podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený krok oxidace dále zahrnuje zpracování uvedené vazby oxidačním činidlem vybraným ze skupiny sestávající z peroxidu vodíku a jodu.

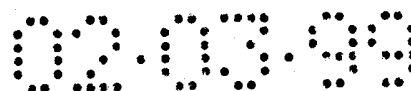
18. Způsob podle nároku 9 v y z n a č u j í c í s e t í m, že R^3 je vodík, a že R^4 a R^5 dohromady a s dusíkem, na který jsou vázány, tvoří nasycený dusíkový



heterocyklus, který má do 10 atomů uhlíku nebo heteroatomů v základním řetězci a celkově od 4 do 20 atomů uhlíku nebo heteroatomů společně, tak, že R^4 a R^5 dohromady a s dusíkem, na který jsou vázány,

obsahují do tří heteroatomů vybraných ze skupiny sestávající z dusíku, kyslíku a síry.

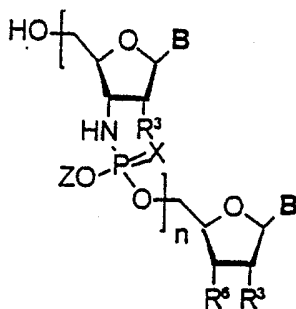
19. Způsob podle nároku 18 vyznačující se tím, že uvedený krok reakce dále zahrnuje zpracování uvedeného monomeru 3'-chráněného aminonukleosid-5'-fosforamiditu s nukleofilním katalyzátorem za vzniku reaktivního meziprojektu.
20. Způsob podle nároku 19 vyznačující se tím, že uvedeným nukleofilním katalyzátorem je tetrazolový aktivátor.
21. Způsob podle nároku 20 vyznačující se tím, že uvedený krok oxidace dále zahrnuje zpracování uvedené vazby oxidačním činidlem vybraným ze skupiny sestávající z peroxidu vodíku a jodu.
22. Způsob podle nároku 4 vyznačující se tím, že uvedený monomer 3'-chráněný aminonukleosid-5'-fosforamidit má aminoskupinu fosforamiditu s pK_a alespoň 10.
23. Způsob podle nároku 22 vyznačující se tím, že uvedený monomer 3'-chráněný aminonukleosid-5'-fosforamidit má tetrazolovou aktivační rovnovážnou konstantu alespoň $10 M^{-1}$.
24. Způsob podle nároku 23 vyznačující se tím, že dále zahrnuje krok překrytí uvedených volných 3'-aminoskupin, které brání reakci s uvedeným monomerem 3'-chráněným aminonukleosid-5'-fosforamiditem.



25. Způsob podle nároku 24 vyznačující se tím, že uvedený monomer 3'-chráněný aminonukleosid-5'-fosforamidit má tetrazolovou aktivační rovnovážnou konstantu, K_1 alespoň 100 M^{-1} .
26. Způsob podle nároku 25 vyznačující se tím, že uvedený krok reakce dále zahrnuje zpracování uvedeného monomeru 3'-chráněného aminonukleosid-5'-fosforamiditu s nukleofilním katalyzátorem za vzniku reaktivního meziprojektu.
27. Způsob podle nároku 26 vyznačující se tím, že uvedeným nukleofilním katalyzátorem je tetrazolový aktivátor.
28. Způsob podle nároku 27 vyznačující se tím, že uvedený krok oxidace dále zahrnuje zpracování uvedené vazby oxidačním činidlem vybraným ze skupiny sestávající z peroxidu vodíku a jodu.
29. Způsob podle nároku 1 vyznačující se tím, že dále zahrnuje krok opakování kroků (b) až (d), až je uvedený oligonukleotid $\text{N3}' \rightarrow \text{P5}'$ fosforamidat syntetizován.
30. Způsob podle nároku 29 vyznačující se tím, že uvedený monomer 3'-chráněný aminonukleosid-5'-fosforamidit má stericky bráněnou aminoskupinu fosforamiditu s pK_a alespoň 10.
31. Způsob podle nároku 30 vyznačující se tím, že dále zahrnuje krok překrytí uvedených volných 3' aminoskupin, které brání reakci s uvedeným monomerem 3'-chráněným aminonukleosid-5'-fosforamiditem.
32. Způsob podle nároku 31 vyznačující se tím, že uvedenou stericky bráněnou fosforamiditovou aminoskupinou je alkylaminoskupina, dialkylaminoskupina, cykloalkylaminoskupina, dicykloalkylaminoskupina nebo aralkylaminoskupina, která má od 6 do 20 atomů uhlíku.



33. Způsob podle nároku 32 vyznačující se tím, že uvedený krok reakce dále zahrnuje zpracování uvedeného monomeru 3'-chráněného aminonukleosid-5'-fosforamiditu s nukleofilním katalyzátorem za vzniku reaktivního meziprojektu.
34. Způsob podle nároku 33 vyznačující se tím, že uvedeným nukleofilním katalyzátorem je tetrazolový aktivátor.
35. Způsob podle nároku 34 vyznačující se tím, že uvedený monomer 3'-chráněný aminonukleosid-5'-fosforamidit má tetrazolovou aktivační rovnovážnou konstantu, K_1 alespoň 100 M^{-1} .
36. Způsob podle nároku 35 vyznačující se tím, že uvedený krok oxidace dále zahrnuje zpracování uvedené vazby oxidačním činidlem vybraným ze skupiny sestávající z peroxidu vodíku a jodu.
37. Způsob syntézy oligonukleotidu vzorce



kde: B je purin nebo pyrimidin nebo jejich analog; X je kyslík nebo síra; R^3 je vodík, fluor nebo hydroxyl; R^6 je aminoskupina nebo hydroxyl; Z je vodík,



alkalický kov nebo aminový kation a n je alespoň 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kroky postupu:

(a) poskytnutí prvního nukleosidu navázaného na nosič z pevné fáze, první nukleosid má chráněnou 3'-aminoskupinu;

(b) odebrání chránění z chráněné 3'-aminoskupiny na formu volné 3'-aminoskupiny;

(c) reakci volné 3'-aminoskupiny s monomerem 3'-chráněným aminonukleosid-5'-fosforamiditem za přítomnosti nukleofilního katalyzátoru na formu internukleosidové N3'→P5' fosforamiditové vazby;

(d) oxidaci uvedené vazby; a

(e) opakování kroků (b) až (d), až je syntetizován požadovaný oligonukleotid.

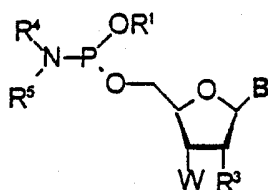
38. Způsob podle nároku 37 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje krok překrytí uvedených volných 3'aminoskupin, které brání reakci s uvedeným monomerem 3'-chráněným aminonukleosid-5'-fosforamiditem.

39. Způsob podle nároku 38 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený monomer 3'-chráněný aminonukleosid-5'-fosforamidit má stericky bráněnou aminoskupinu fosforamiditu s pK_a alespoň 10.

40. Způsob podle nároku 39 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje krok opakování uvedených kroků (c) a (d) vícenásobně během každého cyklu uvedených kroků (b) až (d).

41. Způsob podle nároku 40 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené kroky (c) a (d) se opakují dvakrát během každého cyklu uvedených kroků (b) až (d).

42. Způsob podle nároku 41 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený monomer 3'-chráněný aminonukleosid-5'-fosforamidit má s formu:



kde:

B je pyrimidin, purin, nebo jejich analog;

R^1 je fosfátová chránící skupina;

W je buď $-NHR^2$ nebo $-OR^7$, kde R^2 je amino-chránící skupina a kde R^7 je hydroxyl chránící skupina;

R^3 je vodík, hydroxyl, fluor nebo $-OR'$, kde R' je alkyl s 1 až 3 atomy uhlíku nebo hydroxyl chránící skupina; a

R^4 a R^5 dohromady s dusíkem, na který jsou navázány, tvoří alkylaminovou nebo arylaminovou odstupující skupinu, která má do 40 atomů vybraných ze skupiny sestávající z uhlíku, kyslíku, síry a dusíku.

43. Způsob podle nároku 42 vyznačující se tím, že R^3 je vodík, uvedeným nukleofilním katalyzátorem je tetrazolový aktivátor, a R^4 a R^5 samostatně jsou alkyl, aralkyl, cykloalkyl nebo cykloalkylalkyl mající celkově sloučených od 6 do 20 atomů uhlíku.

44. Způsob podle nároku 43 vyznačující se tím, že uvedený krok oxidace dále zahrnuje zpracování uvedené vazby oxidačním činidlem vybraným ze skupiny sestávající z jodu, chloru, peroxidu vodíku, peroxykyselin, směsných acyl-anhydridů kyseliny sulfinové, peroxidů, ozonu, elementární síry, thiuram-disulfidů, acyldisulfidů, fosfinothioyl-disulfidů a 1,1-dioxo-3H-1,2-benzodithiol-3-onu.



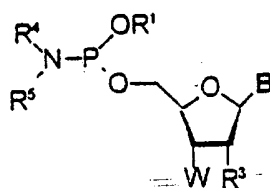
45. Způsob podle nároku 44 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e R^1 je methyl, β -kyanoethyl nebo 4-nitrofenylethyl; R^2 je trifenylmethyl; a n j e v rozmezí od 1 do 50.
46. Způsob podle nároku 42 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e R^3 je vodík a že R^4 a R^5 dohromady tvoří alkylenový řetězec obsahující do 6 atomů uhlíku v základním řetězci a celkově od 4 do 12 atomů uhlíku s oběma koncovými valenčními vazbami uvedeného řetězce navázanými na atom dusíku, na který jsou R^4 a R^5 navázány.
47. Způsob podle nároku 46 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedeným nukleofilním katalyzátorem je tetrazolový aktivátor; R^1 je methyl, β -kyanoethyl, nebo 4-nitrofenylethyl; R^2 je trifenylmethyl; n j e v rozmezí od 1 do 50; a uvedený krok oxidace dále zahrnuje zpracování uvedené vazby oxidačním činidlem vybraným ze skupiny sestávající z jodu, chloru, peroxidu vodíku, peroxykyselin, směsných acyl-anhydridů kyseliny sulfinové, peroxidů, ozonu, elementární síry, thiuram-disulfidů, acyldisulfidů, fosfinothioyl-disulfidů a 1,1-dioxo-3H-1,2-benzodithiol-3-onu.
48. Způsob podle nároku 42 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e R^3 je vodík a že R^4 a R^5 dohromady a s dusíkem, na který jsou navázány, tvoří nasycený dusíkový heterocyklus, který má do 10 atomů uhlíku nebo heteroatomů v základním řetězci a celkově od 4 do 20 atomů uhlíku nebo heteroatomů dohromady, tak, že R^4 a R^5 dohromady a s dusíkem, na který jsou navázány, obsahují do tří heteroatomů vybraných ze skupiny sestávající z dusíku, kyslíku a síry.
49. Způsob podle nároku 48 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedeným nukleofilním katalyzátorem je tetrazolový aktivátor, a že uvedený krok oxidace dále zahrnuje zpracování uvedené vazby oxidačním činidlem vybraným ze skupiny sestávající z jodu, chloru, peroxidu vodíku, peroxykyselin, směsných acyl-anhydridů kyseliny sulfinové, peroxidů, ozonu, elementární síry, thiuram-



disulfidů, acyldisulfidů, fosfinothioyl-disulfidů a 1,1-dioxo-3H-1,2-benzodithiol-3-onu.

50. Způsob podle nároku 49 vyznačující se tím, že R^1 je methyl, β -kyanoethyl nebo 4-nitrofenylethyl; R^2 je trifenylmethyl; a n je v rozmezí od 1 do 50.

51. Sloučenina vzorce:



kde:

B je pyrimidin, purin, nebo jejich analog;

R^1 je fosfátová chránící skupina;

W je buď $-NHR^2$ nebo $-OR^7$, kde R^2 je amino-chránící skupina a kde R^7 je hydroxyl chránící skupina;

R^3 je vodík, hydroxyl, fluor nebo $-OR'$, kde R' je alkyl s 1 až 3 atomy uhlíku nebo hydroxyl chránící skupina; a

R^4 a R^5 dohromady s dusíkem, na který jsou navázány, tvoří alkylaminovou nebo arylaminovou odstupující skupinu, která má do 40 atomů vybraných ze skupiny sestávající z uhlíku, kyslíku, síry a dusíku.

52. Sloučenina podle nároku 51, kde R^3 je vodík; a R^4 a R^5 samostatně jsou alkyl, aralkyl, cykloalkyl nebo cykloalkylalkyl mající celkově sloučených od 6 do 20 atomů uhlíku.

53. Sloučenina podle nároku 44, kde R^1 je methyl, β -kyanoethyl nebo 4-nitrofenylethyl; R^2 je trifenylmethyl; R^7 je di-p-anisylfenylmethyl; a R^4 a R^5 samostatně jsou isopropyl, sek.butyl, isobutyl, t.butyl, cyklohexyl nebo 2-ethylhexyl.

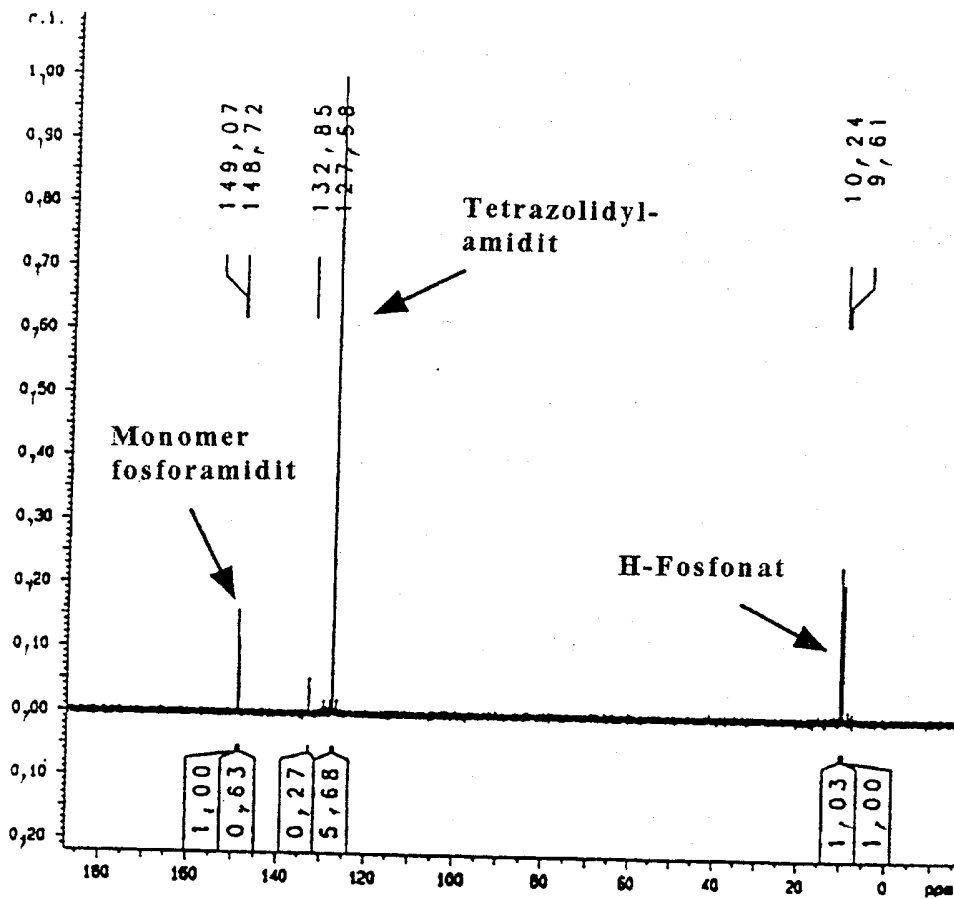


54. Sloučenina podle nároku 51, kde R^3 je vodík a kde R^4 a R^5 dohromady tvoří alkylenový řetězec obsahující do 6 atomů uhlíku v základním řetězci a celkově od 4 do 12 atomů uhlíku s oběma koncovými valenčními vazbami uvedeného řetězce navázanými na atom dusíku, na který jsou R^4 a R^5 navázány.
55. Způsob podle nároku 42 vyznačující se tím, že R^3 je vodík, a že R^4 a R^5 dohromady a s dusíkem, na který jsou navázány, tvoří nasycený dusíkový heterocyklus, který má do 10 atomů uhlíku nebo heteroatomů v základním řetězci a celkově od 4 do 20 atomů uhlíku nebo heteroatomů dohromady, tak, že R^4 a R^5 dohromady a s dusíkem, na který jsou navázány, obsahují do tří heteroatomů vybraných ze skupiny sestávající z dusíku, kyslíku a síry.
56. Sloučenina podle nároku 55, kde R^1 je methyl, β -kyanoethyl nebo 4-nitrofenylethyl; R^2 je trifenylmethyl; a R^4 a R^5 společně a s dusíkem, na který jsou navázány, jsou dimethylpiperidinyl, pyrrolidinyl, dimethylmorfolino-, tetramethylmorfolino-, dimethylpyrrolidinyl, tetramethylpyrrolidinyl, nebo tetramethylpiperidinyl.
57. Způsob syntézy oligonukleotid $N3' \rightarrow P5'$ fosforamidatu na pevné nosičové fázi vyznačující se tím, že zahrnuje kroky:
 poskytnutí monomeru 3'-chráněného aminonukleosid-5'-fosforamidotu, který má fosforamiditovou aminoskupinu; a
 interakci monomeru 3'-chráněného aminonukleosid-5'-fosforamidotu na 3'-primární aminoskupinu oligonukleotid $N3' \rightarrow P5'$ -fosforamidatu výměnou fosforamiditové aminoskupiny uvedeného monomeru s 3' primární aminoskupinou oligonukleotid $N3' \rightarrow P5'$ fosforamidatu.
58. Způsob podle nároku 57 vyznačující se tím, že uvedená fosforamiditová aminoskupina uvedeného chráněného monomeru aminonukleosid-5'-fosforamidotu má pK_a alespoň 8.

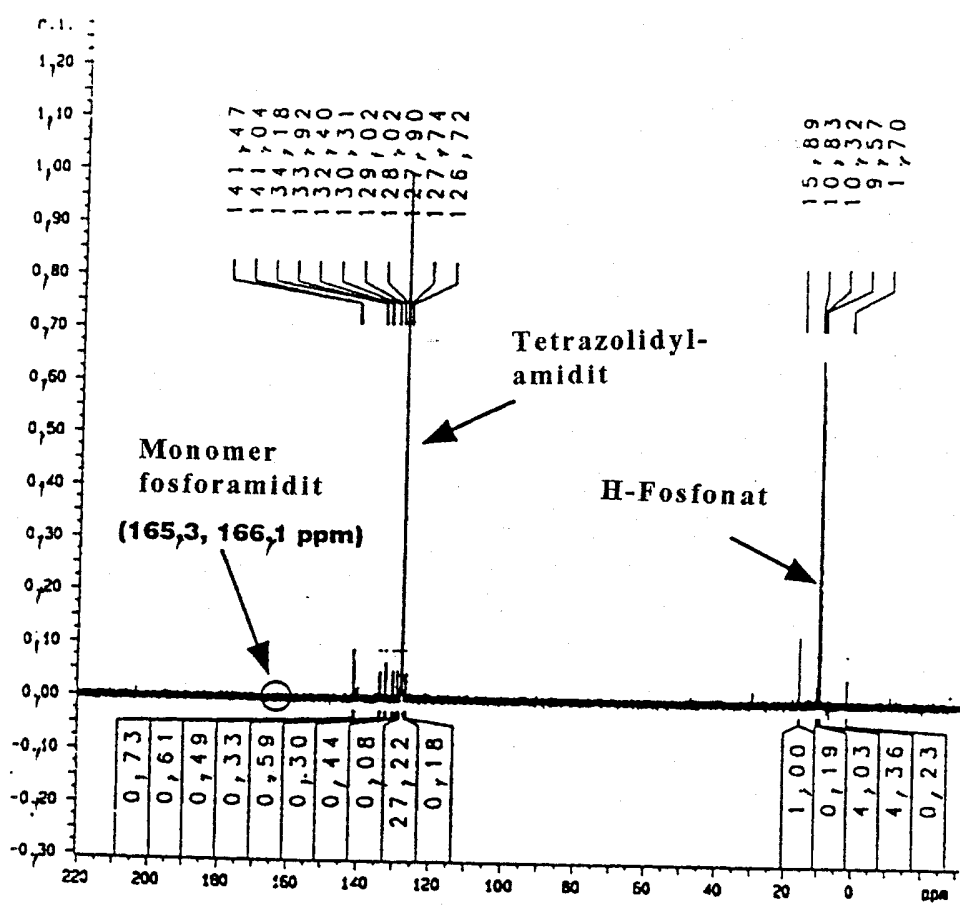
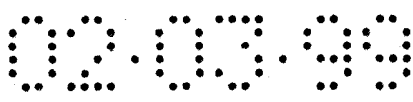


59. Způsob podle nároku 58 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený krok interakce dále zahrnuje vytvoření N3'→P5' fosforamiditové vazby.
60. Způsob podle nároku 59 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále zahrnuje krok oxidace uvedené N3'→P5' fosforamiditové vazby na formu N3'→P5' fosforamidatové vazby nebo N3'→P5' fosforthioamidatové vazby.
61. Způsob podle nároku 60 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tetrazolová aktivační rovnovážná konstanta uvedeného monomeru 3'-chráněného aminonukleosid-5'-fosforamiditu je alespoň 100 M⁻¹.
62. Způsob podle nároku 61 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále zahrnuje krok několikanásobného opakování uvedených kroků interakce a oxidace.
63. Způsob podle nároku 62 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená několikanásobnost znamená dvakrát.
64. Způsob podle nároku 63 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje krok překrytí uvedených 3'-primárních aminoskupin, které brání interakci s uvedeným monomerem 3'-chráněným aminonukleosid-5'-fosforamiditem.

00.03.99



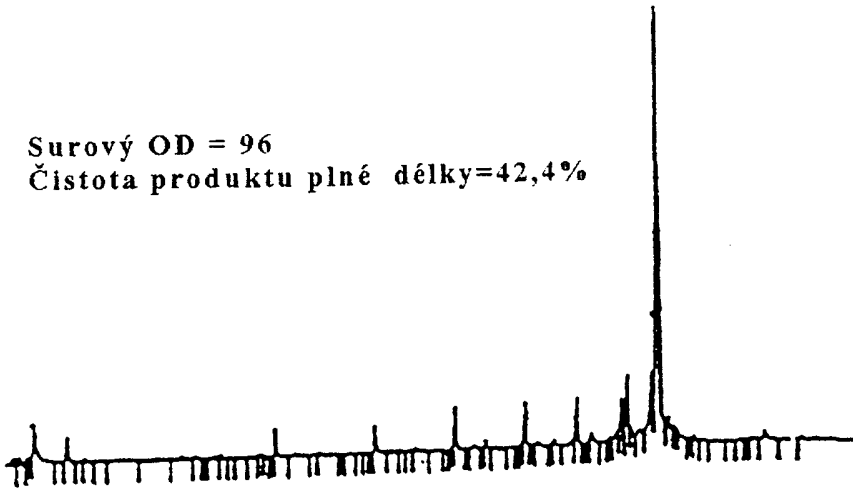
Obr. 1



Obr. 2

00.03.99

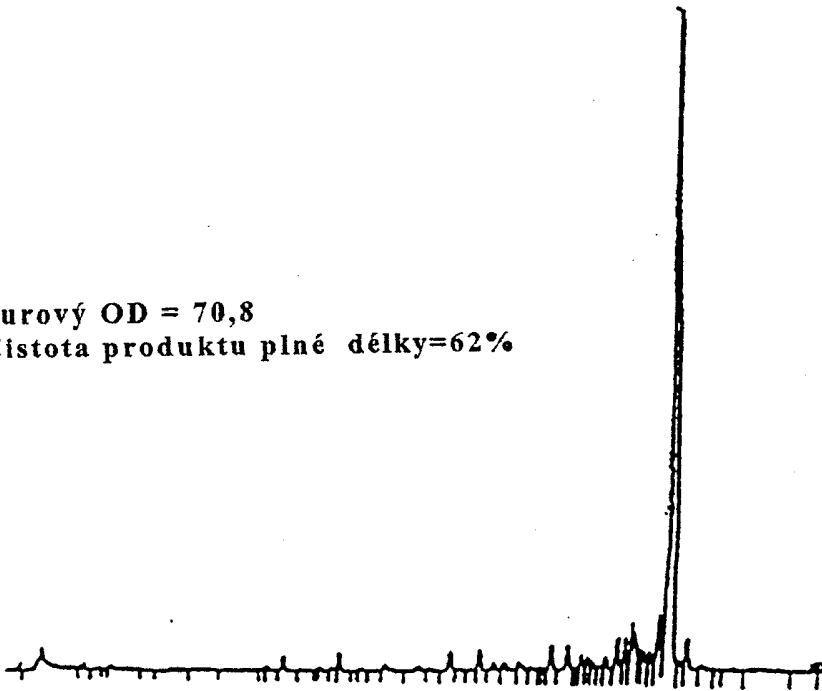
Surový OD = 96
 Čistota produktu plné délky=42,4%



10N-Výměnná HPLC 5'-AAC-GAG-TTG-GGG-CAT-3'

Obr.3a

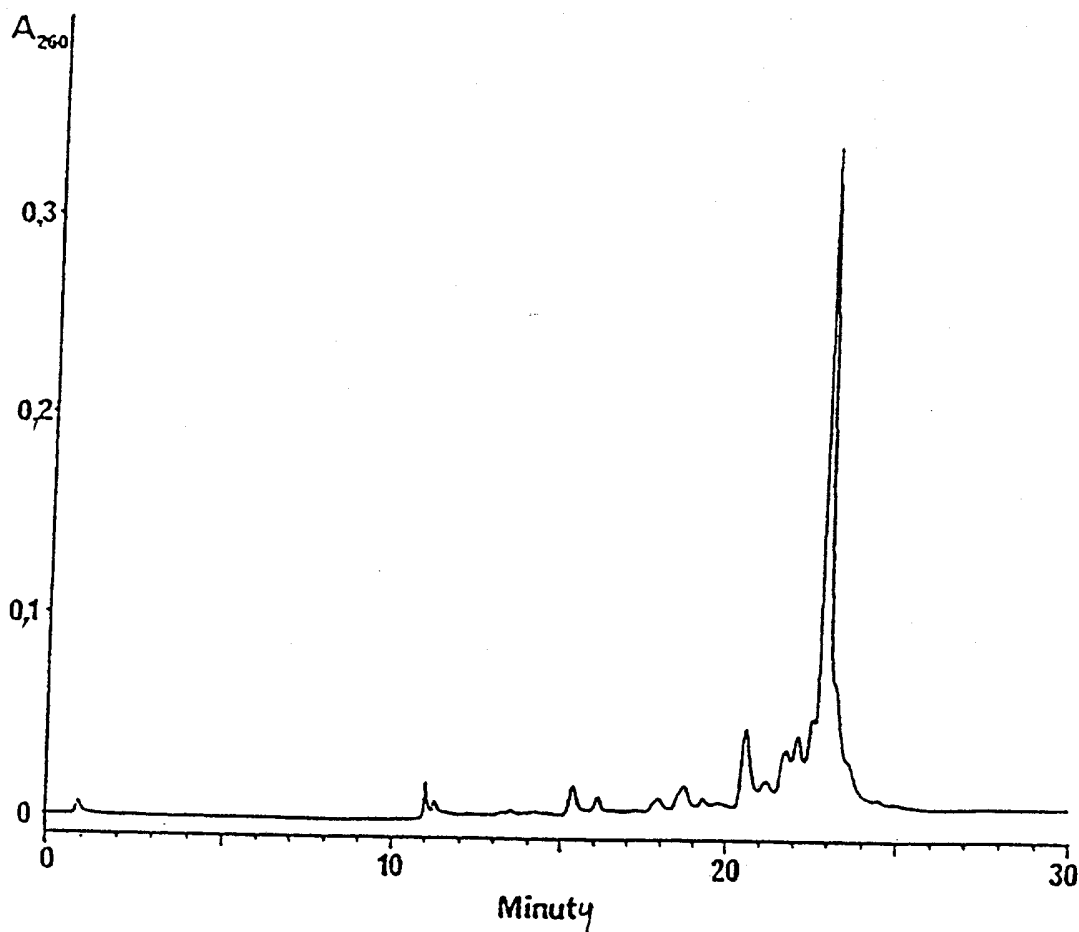
Surový OD = 70,8
 Čistota produktu plné délky=62%



10N-Výměnná HPLC 5'-TTC-TCT-CTC-TA-3'

Obr.3b

02.03.99



Obr. 4.