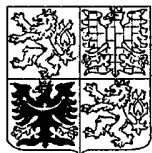


UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

10042

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1997 - 6620

(22) Přihlášeno: 02.11.1995

(30) Právo přednosti:
02.11.1994 US 1994/333895

(47) Zapsáno: 06.06.2000

(86) PCT číslo: PCT/US95/14599

(87) PCT číslo zveřejnění WO 96/14330

(13) Druh dokumentu: U1

(51) Int. Cl.⁷:

C 07 H 21/00

(73) Majitel :

ICN PHARMACEUTICALS, INC., Costa Mesa, CA,
US;

(72) Původce :

Ramasamy Kandasamy, Laguna Hills, CA, US;
Wang Guangyi, Irvine, CA, US;
Seifert Wilfried, La Jolla, CA, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273, Praha
4, 14021;

(54) Název užitého vzoru:

Nukleosidy s modifikovaným cukrem

CZ 10042 U1

Nukleosidy s modifikovaným cukrem

Oblast techniky

Technické řešení se týká polynukleotidových analogů, které neobsahují furanosový kruh.

Dosavadní stav techniky

- 5 Oligonukleotidy, které se váží sekvenčně specificky ke komplementárním nukleovým kyselinám (tj. sense vlákně) vodíkovými vazbami tak, že inhibují expresi genu, jsou obecně označovány jako antisense oligonukleotidy. Tyto syntetické oligonukleotidy se váží na cíl (mRNA), a tak inhibují translaci mRNA. Tento antisense princip (Uhlmann, E., a kol., *Chem. Reviews*, 1990, **90**, 543-584; a Stein, C. A., a kol., *Cancer Res.*, 1988, **48**, 2659-2688) je v přírodě používán pro regulaci exprese genu. Tento antisense princip byl v laboratoři použit nejen pro inhibici, ale také pro aktivaci exprese genu. Zamecnik a Stephenson jako první navrhli, v roce 1978, použití syntetických oligonukleotidů pro terapeutické účely (Stephenson, M.L. a Zamecnik, P.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75**, 280 a 285). Specifická inhibice antisense polynukleotidem je založena na specifickém Watsonově-Crickově párování bází mezi heterocyklickými bázemi antisense oligonukleotidu a virové nukleové kyseliny. Proces vazby oligonukleotidů ke komplementární nukleové kyselině se nazývá hybridizace. Zejména je středem zájmu oligomer, který má komplementární sekvenci bází k sekvenci mRNA, která kóduje protein nezbytný pro rozvoj nemoci. Specifickou hybridizací k mRNA může být přerušena syntéza proteinu kódovaného mRNA.
- 20 Příprava nemodifikovaných oligonukleotidů, tj. oligonukleotidů, které mají strukturu DNA, byla středem zájmu mnoha výzkumných týmů v posledním desetiletí. Syntéza přes fosforamidity podle Carutherse (McBride, L.J. a Caruthers, M.H., *Tetrahedron Letters*, 1983, **24**, 245) původně popsaná Letsingerem (Letsinger, R.L. a Lunsford, W. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 3655) jako fosfitriesterová metoda, je v současnosti nejúčinnějším způsobem přípravy fosforodiesterových oligonukleotidů. Pokud jsou normální, tj. nemodifikované, oligonukleotidy použity jako antisense oligonukleotidy, dochází k problémům s nestabilitou vůči nukleasám a nedostatečnou průchodností skrz membránu. Aby antisense oligonukleotidy byly schopné inhibovat translaci, musí dosáhnout v nezměněné podobě vnitřek buňky. Vlastnosti potřebné pro oligonukleotidy použitelné jako antisense inhibitory zahrnují: (i) stabilitu oligonukleotidů proti extra- a intrabuněčným enzymům; (ii) schopnost procházet skrz buněčnou membránu a (iii) schopnost hybridizovat cílovou DNA nebo RNA (Agarwal, K.L. a kol., *Nucleic Acids Res.*, 1979, **6**, 3009; Agarwal, S. a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 7079). Tím vznikl zájem o vývoj polynukleotidových analogů, které mají lepší vlastnosti pro použití jako antisense nebo pro použití jako primery nebo hybridizační sondy.
- 35 Modifikované polynukleotidy byly syntetizovány již v minulosti a tyto modifikace zahrnují methylfosfonáty, fosforothioáty, různé amidáty a cukerné zbytky nukleových kyselin. Tyto substituce základního řetězce propůjčují určitým způsobem zvýšenou stabilitu, ale jejich nevýhodou je, že vedou ke vzniku chirálního fosforu ve spojení, což vede ke vzniku 2ⁿ diastereomerů, kde n je počet modifikovaných diesterových spojek v oligomeru. Přítomnost mnoha diastereomerů značně oslabí schopnost modifikovaného oligonukleotidu hybridizovat cílové sekvence. Některé z těchto substitucí také udrží schopnost dodávat záporný náboj a přítomnost nabitých skupin sníží schopnost sloučenin procházet buněčnými membránami. Existuje mnoho dalších nevýhod spojených s těmito modifikovanými spojkami v závislosti na přesné povaze spojení.
- 45 Byly syntetizovány některé oligonukleotidové analogy obsahující cukerné modifikace. Dříve použité cukerné modifikace (deoxy)ribosových nukleových kyselin zahrnují a-DNA, homoDNA, morfolinové a thionukleosidy a peptidové nukleové kyseliny (PNA) poskytly zlepšené struktury, zejména struktury, které lépe pronikají do buňky. Obecné syntetické schéma pro přípravu takových analogů zahrnuje použití primární hydroxylové skupiny nukleosidu nebo jeho

nukleotidu buď pro vazbu k polymernímu nosiči nebo k sekvenčně specifikovanému 3'-nukleotidu s atomem fosforu v pětivazném nebo trojvazném stavu. Konkrétní procedury pro spojování byly referovány jako fosfitriesterová (fosforamiditová), fosfordiesterová a H-fosfonátová metoda. Komerčně dostupné monomerní a polymerní nosiče, ke kterým jsou vázány monomery jsou pro tyto metody dostupné s chráněnými bázemi (G, A, C, T, U a jiné heterocykly) spolu s chráněnými atomy fosforu, které umožňují skladování a brání nespecifickým reakcím během spojovacích procesů.

Nukleové kyseliny, které obsahují modifikované cukry, neionické základní řetězce nebo acyklické polyamidy (PNA) mají, do určitého stupně, jednu nebo více následujících vlastností použitelných pro modulaci genu: zlepšení stability dvojšroubovice (účinnost hybridizace), zvýšení cílové specifity, stabilita proti nukleasám, zlepšený průnik do buňky a pomoc v důležitých terminačních dějích nukleových kyselin (např. Rnasa H aktivita, katalytické odbourávání, ukončení hybridizace a další). Také bylo navrženo použití karbonátdiesterů. Ale tyto sloučeniny jsou vysoce nestabilní a karbonátdiesterové spojení neudrží tetrahedrální konfiguraci tvořenou fosforem ve fosfordiesteru. Podobně karbamátové spojky, ačkoliv jsou achirální, propůjčují trigonální symetrii a bylo prokázáno, že poly dT s těmito spojeními příliš nehybridizuje s poly dA (Coull, J.M. a kol. *Tetrahedron Letters*, 1987, 28, 745; Stirchak, E.P. a kol, *J. Org. Chem.*, 1987, 52, 4202).

Nejnověji se v literatuře objevily zprávy o acyklických cukerných analogích (Augustyns, K.A. a kol., *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 2587-2593). Zahnutí těchto acyklických nukleosidů do oligonukleotidů způsobilo snížení T_m, v závislosti na počtu spojek vestavěných do oligomerů. O těchto oligonukleotidech bylo zjištěno, že jsou enzymaticky stabilní a párují báze s komplementární sekvencí. Uvedené nedostatky polynukleotidů a známých polynukleotidových analogů vedou k tomu, že vzrůstá zájem o poskytnutí nových polynukleotidových analogů, které lze použít pro antisense inhibici a jiné techniky, které zahrnují použití oligomerů.

Pokusy o modifikaci jak cukerné složky, tak základního řetězce mají některé nevýhody při použití jako léku a i u jiných metod. Než budou k dispozici účinné terapeutické, diagnostické a výzkumné nástroje, jsou potřebná značná vylepšení stávajících kvalit. Díky tomu, existuje velká potřeba zlepšených oligomerních analog oligonukleotidů jako farmaceutických sloučenin.

Předkládané technické řešení poskytuje nové oligonukleotidy a jejich strukturní prekursory, které mají zlepšenou odolnost proti odbourávání nukleasami, a které mají zvýšenou stabilitu za fyziologických podmínek, a které jsou neutrální nebo mají kladný náboj, což umožňuje zvýšit přístup do buňky. Navíc, nové oligonukleotidy podle předkládaného technického řešení mají lepší hybridizační vlastnosti ve vztahu k cílovým nukleovým kyselinám.

Oligomery podle předkládaného technického řešení jsou obecně charakterizovány tak, že obsahují série vázaných spojek nebo monomerů, které jsou vhodné pro vazbu heterocyklických bází k cílové nukleové kyselině sekvenčně specifickým způsobem. Vázané spojky popsané v předkládaném technickém řešení, při zahrnutí do oligomerů, mohou způsobit větší než jednoduché vodíkové vazby.

Nukleomonomery podle předkládaného technického řešení jsou obecně charakterizovány jako skupiny nebo zbytky, které nahrazují furanosový kruh, který se nalézá v přirozeně se vyskytujících nukleotidech, aminokyselinovým nebo modifikovaným aminoalkoholovým zbytkem. Příklady monomerů a oligomerů podle předkládaného technického řešení jsou sloučeniny obecných vzorců (I) až (LXIII). Zahnutí těchto monomerů do oligonukleotidů, které je uvedeno v předkládaném technickém řešení, umožňuje syntézy sloučenin se zlepšenými vlastnostmi, přičemž tyto vlastnosti zahrnují (i) zvýšenou lipofilitu, která je důsledkem eliminace náboje spojeného s fosfordiesterovými spojkami (Dalge, J.M., a kol., *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 1805) a (ii) odolnost proti degradaci enzymy jako jsou nukleasy. Oligomery, které obsahují tyto monomery jsou dosti stabilní pro hybridizaci k cílovým sekvencím a překonávají nemodifikované nukleosidy v jedné nebo i více aplikacích.

Podstata technického řešení**Shrnutí technického řešení:**

Předkládané technické řešení poskytuje různé nové analogy oligonukleotidů, které mají jednu nebo více vlastností takových, že tyto sloučeniny překonávají běžné oligonukleotidy při použití
 5 v postupech, ve kterých se využívají oligonukleotidy. Sloučeniny podle předkládaného technického řešení jsou oligonukleotidové analogy, ve kterých je furanosový kruh přirozeně se vyskytujícími nukleovými kyselinami, nahrazen aminokyselinovým nebo aminoalkoholovým zbytkem. Některá provedení nových sloučenin podle předkládaného technického řešení jsou zejména použitelná pro antisense kontrolu genové exprese. Sloučeniny podle předkládaného
 10 technického řešení lze také použít jako primery nebo jako sondy hybridizace nukleových kyselin.

Dalším předmětem předkládaného technického řešení je poskytnout monomerní prekurzory oligonukleotidových analogů podle předkládaného technického řešení. Tyto monomerní prekurzory lze použít k syntéze polynukleotidových analogů.

Dalším předmětem předkládaného technického řešení je poskytnout prostředky z uvedených
 15 polynukleotidových analogů, které jsou určeny pro léčení nebo prevenci nemocí. Ještě dalším předmětem předkládaného technického řešení je poskytnout způsob léčení nebo prevence nemocí, zejména virových infekcí a poruch růstu buněk. Uvedené způsoby léčení nemocí zahrnují krok podávání účinného množství uvedených polynukleotidových analogů pro použití jako antisense inhibitory.

Stručný popis obrázků:

Obrázky 1 až 25 jsou vyobrazení chemických reakčních schémat použitelných pro syntézu monomerů a oligonukleotidů podle předkládaného technického řešení. Konkrétněji, obrázek 1 ukazuje syntézu L-serinolem spojeného thyminového monomerního fosforamiditu se spojkou
 –CH₂–CO– mezi thyminem a serinolem.

25 Obrázek 2 ukazuje syntézu L-serinolem spojeného thyminového monomerního fosforamiditu se spojkou –CH₂–CH₂– mezi thyminem a serinolem.

Obrázky 3 a 4 ukazují syntézu substituovaných L-serinolem spojených thyminových monomerních fosforamiditů se spojkou –CH₂–CO– mezi thyminem a serinolem.

30 Obrázek 5 ukazuje syntézu T–T dimeru, který má pět atomů dlouhou mezinukleotidovou spojkou, která uprostřed sestává z hydroxylaminu a ze spojky –CH₂–CO– mezi thyminem a serinolem.

Obrázek 6 ukazuje syntézu thyminového monomerního fosforamiditu, ve kterém je thymin připojen k N-ethylhydroxylaminu spojkou –CH₂–CO–.

35 Obrázek 7 ukazuje syntézu L-serinolem spojeného thyminového monomerního fosforamiditu, ve kterém je –NH₂ skupina L-serinu připojena k 2-hydroxyacetylové skupině a hydroxylová skupina je blokována skupinou DMT. Tento stavení blok se používá pro spojení 2'–5'. Tento obrázek také ukazuje syntézu thyminového monomeru, ve kterém je –NH₂ skupina L-serinu připojena k 2'-hydroxyethyllové skupině.

40 Obrázek 8 ukazuje syntézu T–T dimeru, který má hydroxamátový základní řetězec se spojením 2'–5'. V tomto dimeru je jeden stavební blok vyroben z kyseliny L-asparagové a thyminu a druhý z L-serinu a thyminu. Tento dimer má dvě další amidové vazby v základním řetězci.

Obrázek 9 ukazuje syntézu T–T dimeru, který má hydroxamátový základní řetězec se spojením 2'–5'. V tomto dimeru je jeden stavební blok vyroben z kyseliny L-asparagové a thyminu a druhý z L-serinu a thyminu. Tento dimer nemá v základním řetězci amidové vazby.

45 Obrázek 10 ukazuje syntézu L-serinol-β-alaninem spojeného thyminového monomerního fosforamiditu, ve kterém β-alanin spojuje thymin a serinol.

Obrázek 11 ukazuje syntézu L-serinol-alkylaminem spojeného thyminového monomerního fosforamiditu, ve kterém alkylamin spojuje thymin a serinol.

Obrázek 12 ukazuje syntézu T-T dimeru, který má hydroxamátový základní řetězec se spojením 4'-5'. Tento dimer je vyroben ze dvou jednotek kyseliny L-asparagové a dvou jednotek thyminu s acetylovou spojkou mezi thyminem a kyselinou asparagovou.

5 Obrázek 13 ukazuje syntézu T-T dimeru, který má hydroxamátový základní řetězec se spojením 4'-5'. Tento dimer je vyroben ze dvou jednotek kyseliny L-asparagové a dvou jednotek thyminu s ethylovou spojkou mezi thyminem a kyselinou asparagovou.

Obrázek 14 ukazuje syntézu thyminového stavebního bloku spojeného N-hydroxyamino-kyselinou.

10 Obrázek 15 ukazuje syntézu L-asparagovou kyselinou spojeného thyminového stavebního bloku s N-hydroxylaminovou spojkou mezi thyminem a kyselinou asparagovou.

Obrázek 16 ukazuje syntézu T-T dimeru, který má hydroxamátový základní řetězec se spojením 4'-5'. V tomto dimeru je karboxylová skupina připojena k thyminovému stavebnímu bloku pomocí N-hydroxylaminové spojky.

15 Obrázek 17 ukazuje syntézu N-hydroxyaminokyselinového stavebního bloku strukturního vzorce (CCLXXXI) substituovaného thymidinocetovou kyselinou a jeho analogu strukturního vzorce (CCLXXX). Tyto monomerní stavební bloky jsou vhodné pro tvorbu nukleových kyselin s hydroxamátovým základním řetězcem.

20 Obrázek 18 ukazuje syntézu aminokyselinových stavebních bloků strukturního vzorce (CCLXXXVIII) a strukturního vzorce (CCLXXXIX) substituovaných thymidinocetovou kyselinou. Tyto monomery jsou vhodné pro tvorbu nukleových kyselin s amidovým základním řetězcem s hydroxylaminovými funkcemi.

Obrázek 19 ukazuje syntézu L-serinolem spojeného thymidinového stavebního bloku strukturního vzorce (CCXCVII), který má mezi thyminem a serinolem hydroxylaminovou skupinu. Tento stavební blok je vhodný pro nukleové kyseliny se spojeními 4'-5'.

25 Obrázek 20 ukazuje syntézu glutamovou kyselinou - glycinem spojeného thyminového monomeru strukturního vzorce (CCCV). Tento monomerní stavební blok je vhodný pro tvorbu nukleové kyseliny s amidovým základním řetězcem a spojeními 2'-5'.

30 Obrázek 21 ukazuje syntézu glycinol-glycinem spojeného thymidinového stavebního bloku strukturního vzorce (CCCXII) a strukturního vzorce (CCCXIII), který má mezi thyminem a glycinolem hydroxylaminovou skupinu. Tyto stavební bloky jsou vhodné pro přípravu nukleových kyselin se spojeními 2'-5'.

Obrázky 22 až 24 ukazují syntézu ribosou - aminokyselinou spojené thymidinové stavební bloky strukturních vzorců (CCCXIX), (CCCXXIX) a (CCCXXXVIII). Tyto stavební bloky jsou vhodné pro přípravu oligonukleotidů, které mají základní řetězec ribosa - amid.

35 Obrázek 25 ukazuje syntézu oligonukleotidu strukturního vzorce (CCCXLVI), který má základní řetězec ribosa - amid, na pevné fázi.

Obrázek 26 ukazuje syntézu 1-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-[amino(thyminylacetyl)]-L-propan-3-O-(N,N-diisopropyl)-kyanoethylfosforamiditu.

40 Obrázek 27 ukazuje syntézu 1-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-[amino(thyminylacetyl)]-D-propan-3-O-(N,N-diisopropyl)-kyanoethylfosforamiditu.

Obrázek 28 ukazuje syntézu 2-[(4,4'-dimethoxytrityl)-O-acetyl]amino-3-thyminy-L-propan-1-O-(N,N-diisopropyl)-kyanoethylfosforamiditu.

Obrázek 29 ukazuje syntézu N-(thyminylacetyl)-N-[[[(2-isobutyryl)oxy]ethyl]-O-benzylhydroxylaminu.

45 Obrázek 30 ukazuje syntézu (2R,4S)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-[N₃-benzoyl-(thymin-1-yl)]methyl-4-ftalimidopyrrolidinu.

Podrobný popis konkrétních provedení:**A. Definice a zkratky:**

V popisu předkládaného technického řešení budou použity následující termíny, které jsou definovány následujícím způsobem.

5 Tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, "antisense" terapie označuje podávání nebo tvorbu *in situ* oligomerů DNA nebo RNA nebo jejich analogů, které se specificky váží ke komplementární sekvenci cílové nukleové kyseliny. K vazbě může dojít běžným spárováním komplementárních bází nebo jiným mechanismem, například, v případě vazby k duplexům DNA, specifickými interakcemi v hlavním žlábků dvojšroubovice. Obecně označuje "antisense" různé
10 techniky, které jsou pod tímto pojmem popsány v dané problematice, a zahrnují jakoukoliv terapii, která závisí na specifické vazbě k oligonukleotidovým sekvencím. Techniky antisense genové regulace jsou odborníkům na problematiku molekulární biologie dobře známy a popisy antisense genové regulace lze nalézt, například v U.S. patentu 5,107,065, U.S. patentu 5,166,195, U.S. patentu 5,087,617 a práci Crooke, Annual Review Pharmacology Toxicology 1992, 32; 329-
15 376.

Termín "oligomer" nebo "oligonukleotid" jsou zaměnitelné navzájem a zahrnují přirozeně se vyskytující sloučeniny jako jsou RNA a DNA, stejně jako jejich syntetické analogy, včetně sloučenin podle předkládaného technického řešení. Pokud není uvedeno jinak, termíny "oligomer" a "oligonukleotid" označují jak DNA, tak RNA a jejich syntetické analogy. Termín
20 "oligomer" označuje sloučeniny, které obsahují dva nebo více monomerů kovalentně spojených jeden k druhému fosfodiesterovou vazbou nebo jakýmkoliv jinými náhradními spojkami. Pokud není uvedeno jinak, nejsou s termínem "oligomer" spojena žádná délková omezení. Takže oligomer může mít přinejmenším dva kovalentně vázané nukleomomery (dimer) nebo může být znatelně delší. Oligomery mohou být vazebně kompetitivní, a proto se jejich báze mohou
25 párovat s jednovláknovými nebo dvouvláknovými sekvencemi. Oligomery (např. dimery až hexamery) lze také použít jako synthony pro delší oligomery, které jsou popsány v předkládaném technickém řešení. Oligomery mohou obsahovat místa bez bází a pseudonukleosidy.

Oligomery zahrnují oligonukleotidy, oligonukleosidy, polydeoxyribo-nukleotidy (obsahující 2'-deoxy-D-ribosu nebo její modifikované formy), tj. DNA, polyribonukleotidy (obsahující
30 D-ribosu nebo její modifikované formy), tj. RNA, a jakékoliv jiné typy polynukleotidů, kterými jsou N-glykosid nebo C-glykosid purinové nebo pyrimidinové báze. Termín oligomer tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, zahrnuje sloučeniny, ve kterých jsou sousední nukleomomery spojeny hydroxamátovými spojkami. Prvky, běžně nalézané v oligonukleotidech, jako je furanosový kruh a/nebo fosfodiesterová spojka, lze nahradit jakýmkoliv
35 vhodným funkčně ekvivalentním prvkem. Termín "oligomer" zahrnuje jakékoliv struktury, které slouží jako základ nebo podpora pro báze, přičemž tento základ umožňuje vazbu k cílovým nukleovým kyselinám způsobem, který je závislý na sekvenci. Oligomery, které jsou v současnosti známy, lze rozdělit do čtyř skupin, které lze charakterizovat tím, že mají (i) fosfodiesterové spojky nebo spojky z fosfordiesterových analogů (fosforothioát, methylfosfonát, atd.), (ii)
40 náhradní spojky, které obsahují nefosforový isoster (riboacetal, formalacetal, karbamát, atd.), (iii) morfolinové zbytky, karbocyklické zbytky nebo jiné furanosové cukry jako je arabinosa nebo hexosy místo ribosy nebo deoxyribosy a (iv) nukleomomery spojené amidovými vazbami nebo acyklické nukleomomery spojené jakýmkoliv vhodnými náhradními spojkami.

Termín "nukleomonomer" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje
45 skupinu, která zahrnuje (1) bázi kovalentně vázanou k (2) druhé skupině. Nukleomomery zahrnují nukleosidy, nukleotidy nebo báze připojené k aminoalkoholu. Nukleomomery lze spojit do formy oligomerů, tak, že se váží k cílové nebo komplementární sekvenci bází nukleových kyselin sekvencně specifickým způsobem.

"Druhá skupina" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje sloučeninu
50 vázanou k nukleomonomeru a zahrnuje aminokyselinovou / aminoalkoholovou skupinu, obvykle serinol, kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, glycin a ty látky, které obsahují modifikace

aminokyselinové skupiny, například, pokud je jeden nebo více vodíků nahrazeno jinou funkční skupinou (viz sloučeniny strukturních vzorců (XXIV) až (LXIII)) nebo je jedna karboxylová kyselina funkcionalizována na alkohol, aminy, thioly, hydroxylaminy a podobně. Nukleomonomery podle uvedené definice zahrnují také báze připojené k aminokyselině nebo aminoalkoholu

5 a/nebo aminokyselinovému/alkoholovému analogu, který má volnou karboxylovou/hydroxylovou skupinu a/nebo volnou aminoskupinu a/nebo je chráněný.

Termín "nukleosid" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje jeho aminokyselinový a aminoalkoholový derivát, který je popsán dále, nesoucí purin, pyrimidin nebo jejich analogy, které jsou definovány dále, ale nemají spojku, kterou by byl fosfordiesterový

10 analog nebo internukleosidová spojka. "5' " nukleosid znamená nukleosid, který poskytuje 5' uhlík jako bod připojení ke spojce. "5' " konec spojky je připojen k 5' nukleosidu. "3' " konec spojky je připojen ke 3' pozici dalšího nukleosidu. Pokud je použit modifikovaný nukleosid, který neobsahuje přesně 3' a/nebo 5' uhlík, je odborníkovi zřejmé, že označení "3' " a "5' " popisuje polaritu vlákna použitou analogicky podle DNA a RNA.

15 Termín "nukleosid" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje bázi kovalentně připojenou k aminoalkoholovému/aminokyselinovému analogu a který obsahuje spojku mezi bází a aminokyselinou/aminoalkoholem. Termín nukleosid normálně zahrnuje ribonukleosidy deoxyribonukleosidy nebo jakékoliv jiné nukleosidy, které jsou N-glykosidy nebo C-glykosidy báze.

20 Termín "nukleosid" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje nukleosid, který má fosfátovou skupinu nebo fosfátový analog (skupina s fosforem v téže oxidačním stupni jako je fosfátová skupina tj. thiofosfát, amidát).

Termín "báze" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje rozmanité nukleosidové báze, včetně purinových a pyrimidinových heterocyklů a jejich heterocyklických

25 analog a tautomerů. Puriny zahrnují adenin, guanin a xanthin a příklady purinových analogů je 8-oxo-N⁶-methyladenin a 7-deazaxanthin. Pyrimidiny zahrnují uracil a cytosin a jejich analogy jako je 5-methylcytosin, 5-(1-propynyluracil), 5-(1-propynylcytosin), 5-methyluracil a 4,4-ethanocytosin. "Báze" jsou, po připojení k vhodnému základu molekuly, např. fosfordiesterovému základnímu řetězci, schopné párování, které vede k dvouvláknové DNA nebo jiným

30 dvouvláknovým nukleovým kyselinám podobné struktury. Báze jsou také schopné párování do trojšroubovicové nukleové kyseliny.

Termín "modifikace cukru" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje jakoukoliv aminokyselinovou nebo aminoalkoholovou skupinu, která je jiná než 2'-deoxyribosa.

Termín "aminokyseliny/alkoholy" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení,

35 označuje jakékoliv přirozené aminokyseliny a alkoholy a to jak "R" tak "S" izomery.

Termín "nukleosidové spojky" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje spojku, která je mezi monomery.

Termín "spojka" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje skupinu, která se používá ke spojení báze s aminokyselinou / aminoalkoholem a jejich deriváty.

40 Termín "mezinukleotidová spojka" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje fosfordiesterovou skupinu (-O-P(O)(O)-O) nebo jakýkoliv její funkční ekvivalent, který kovalentně spojuje sousední nukleomonomery.

Termín "substituční spojky" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje jakýkoliv analog přirozené skupiny nebo jakoukoliv vhodnou skupinu, která kovalentně spojuje

45 sousední nukleomonomery. Substituční spojky zahrnují fosfordiesterové analogy, např. jako fosforothioát a methylfosfonát a nefosforové spojky, např. jako amidy, hydroxamáty, hydroxylaminy. Substituční spojky zahrnují nefosforové spojky (2', 5' spojky, 3', 5' spojky a 4', 5' spojky) podle předkládaného technického řešení.

Termín "zesítňující skupina" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje

50 skupinu v oligomeru, která tvoří kovalentní vazbu k cílové nukleové kyselině. Zesítňující skupiny

zahrnují kovalentně se vázající činidla, která kovalentně váží oligomer k cílovým nukleovým kyselinám buď spontánně (např. N^4,N^4 -thanocytosin) nebo fotoaktivací (např. psoralen) a podobně.

5 Termín "blokujiící skupiny" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje jiné substituenty než vodík, které jsou kovalentně připojeny k oligomerům nebo nukleomonomerům, buď jako chráničí skupina, spojující skupina pro syntézu, OPO_{3-2} , nebo jiné běžné konjugáty jako je pevná fáze, značení, protilátka, monoklonální protilátka nebo jeho fragment a podobně. Tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje "blokujiící skupina" nejen pouze chráničí skupinu, jak je běžné ve slangové terminologii, ale označuje také, například, spojující
10 skupiny jako je H-fosfonát nebo fosforamidit.

Termín "chráničí skupina" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje jakoukoliv skupinu schopnou chránit O-atom, S-atom nebo N-atom, ke kterému je připojena, aby zabránila jeho účasti na reakci nebo ve vazbě. Takové chráničí skupiny pro N-atomy na bázi v nukleomonomeru a jejich zavedení jsou v dané problematice běžně známy. Nikterak
15 neomezující příklady vhodných chráničích skupin zahrnují: diisobutylformamid, benzoyl, silyl a podobně. Vhodné chráničí skupiny pro O-atomy a S-atomy jsou, například, DMT, MMT, Fmoc nebo estery. "Chráničí skupiny" tak, jak se používají v předkládaném technickém řešení, zahrnují jakoukoliv skupinu schopnou bránit O-atomu, S-atomu nebo N-atomu, ke kterému jsou vázány, v reakci nebo vazbě. Takové chráničí skupiny pro O-, S- a N-atomy v nukleo-
20 monomerech jsou popsány a způsoby jejich zavedení jsou běžně známy v dané problematice. Chráničí skupiny také zahrnují jakékoliv skupiny schopné bránit reakci a vazbě v karboxylových kyselinách, thiolech a podobně.

Termín "spojující skupina" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje skupinu vhodnou pro tvorbu spojek nebo substitučních spojek mezi nukleomonomery jako je
25 hydrogen fosfonát nebo fosforamidit.

Termín "konjugát" nebo "konjugátová skupina" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje jakoukoliv skupinu připojenou k oligomeru na konci nebo v oligomeru samotném. Konjugáty zahrnují pevné fáze jako je silikagel, porézní sklo a polystyren; značení jako je fluorescent, chemiluminescent, radioaktivní atomy nebo molekuly, enzymatické skupiny a
30 reporterové skupiny; transportní činidla pro oligomer jako jsou polykationty, sérové proteiny a glykoproteiny a polymery a podobně. Další konjugáty zahrnují O-cholesterol, polyethylenglykol (PEG), aminokyseliny, interkalátory, polynukleotid vyrovnávací skupiny, zesilující skupiny, lipidy, hydroxamáty, alkylační činidla a podobně.

Termín "synthon" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje strukturní
35 jednotku v oligonukleotidovém analogu podle předkládaného technického řešení.

Termín "transfekce" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje jakýkoliv způsob, který je vhodný pro zlepšení dopravy oligomerů do buňky.

Termín "subjekt" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje rostlinu nebo živočicha, včetně savců, zejména lidí.

40 Termín "deriváty" a monomerní konstituenty oligomerů zahrnuje pojem, který je takto běžně chápán v dané problematice. Například, oligonukleotidy mohou být kovalentně vázány k různým skupinám jako jsou interkalátory, látky, které interagují zejména s malým žlábkem dvojšroubovice DNA a další libovolně vybrané konjugáty jako jsou značení (radioaktivní, fluorescenční, enzymové atd.). Tyto další skupiny mohou být (ale nemusí) odvozeny z modifi-
45 kovaného základního řetězce jako část spojky samotné. Například, interkalátory, jako je akridin, lze připojit přes $R-CH_2-$ připojené přes jakoukoliv přístupnou skupinu $-OH$ nebo SH , např. na 5' koncové pozici RNA nebo DNA, 2' pozici RNA nebo na OH či SH skupinu umístěnou do 5 pozice pyrimidinů, např. místo 5 metylu cytosinu, derivatizovaná forma, která obsahuje
50 $-CH_2CH_2CH_2OH$ nebo $-CH_2CH_2CH_2SH$ v pozici 5. Lze připojit širokou škálu substituentů, včetně těch, které jsou vázány běžnými spojkami. Podle toho lze uvedené OH skupiny v oligomeru obecného vzorce (I) nahradit fosfonátovými skupinami, ochránit standardními

chránicími skupinami nebo aktivovat pro přípravu dalších spojek k jiným nukleotidům nebo je lze vázat ke konjugátu. 5' koncová OH je běžně fosforylována; 2' -OH nebo OH substituenty na 3' konci lze také fosforylovat. Hydroxyly lze také derivatizovat standardními chránicími skupinami.

- 5 Termín "fosforodiesterový analog" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje analog běžné fosforodiesterové spojky stejně jako alternativní spojovací skupiny. Tyto alternativní spojovací skupiny zahrnují, ale tímto výčtem nejsou nijak omezeny, provedení, ve kterých je O-P(O) nahrazeno P(O)S, P(O)NR₂, P(O)R, P(O)OR', kde R je H nebo alkyl (1 až 7 uhlíků) a R' je alkyl (1 až 7 uhlíků). Ne všechny fosforodiesterové analogy ve stejném oligomeru
10 musí být stejné, jediný požadavek je, aby přinejmenším jedna z těchto spojek byla modifikovaná mezinukleotidová spojka popsaná v předkládaném technickém řešení.

- "Analogické" formy purinů a pyrimidinů jsou ty, které jsou obecně známy v dané problematice, mnoho z nich se používá jako chemoterapeutická činidla. Seznam příkladů, který zdaleka není vyčerpávající, zahrnuje 4-acetylcytosin, 8-hydroxy-N⁵-methyl-adenin, aziridinylcytosin, pseudoisocytosin, 5-(karboxy-hydroxymethyl)uracil, 5-fluoruracil, 5-bromuracil, 5-karboxy-methylaminomethyl-2-thiouracil, 5-karboxymethylaminomethyl-uracil, dihydrouracil, inosin, N₆-isopentenyladenin, 1-methyladenin, 1-methylpseudouracil, 1-methylguanin, 1-methylinosin, 2,2-dimethylguanin, 2-methyladenin, 2-methyl-guanin, 3-methylcytosin, 5-methylcytosin, N₆-methyladenin, 7-methyladenin, 7-methylguanin, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyamino-methyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylguanosin, 5'-methoxykarbonylmethyluracil, 5-methoxy-uracil, 2-methylthio-N₆-isopentenyladenin, methylester uracil-5-oxyoctové kyseliny, kyselina uracil-5-oxyoctová, oxybutoxosin, pseudouracil, guenosin, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, methylester kyseliny N-uracil-5-oxyoctové, uracil-5-oxyoctová kyselina, pseudouracil, guenosin, 2-thiocytosin a 2,6-diaminopurin. Zejména preferovaný analog je
20 5-methylcytosin (v tomto dokumentu zkracovaný na "Cme").

- Termín "isosterní" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje prostorové uspořádání a orientaci mezinukleosidového řetězce a skutečnost, že tyto vlastnosti jsou podobné vlastnostem přirozené fosforodiesterové spojky tak, že modifikovaný oligonukleotid, který obsahuje isosterní vazbu nahradí a/nebo hybridizuje s přirozeným oligonukleotidem.

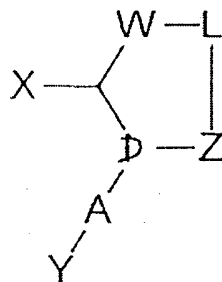
- 30 Termín "ribos-amid" tak, jak se používá v předkládaném technickém řešení, označuje mezinukleotidovou spojku, která kombinuje ribosu / (2'-deoxy) a aminokyseliny.

- Pro označení funkčních skupin a sloučenin jsou v předkládaném technickém řešení použity různé zkratky. Tyto zkratky jsou odborníkům v organické chemii zcela jasné, například "Ph" označuje fenylyl, "Me" označuje methyl, "(1 až 7 uhlíků)" znamená, že daný řetězec sestává z jakéhokoliv množství uhlíkových atomů 1 až 7, atd.
35

Popis technického řešení

- Předkládané technické řešení poskytuje nové oligonukleotidové analogy, které obsahují modifikované aminokyselinové / aminoalkoholové spojky mezi bázemi a základním řetězcem (fosforodiester, fosforothioáty a další jak je uvedeno v tabulce 1) také označované za modifikované nukleotidové spojky.
40

Nukleosid s modifikovaným cukrem obecného vzorce



který patří do kterékoliv z následujících skupin, kde

skupina 1, kde

- 5 X je CHR_2OH , kde R_2 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 Y je $\text{Base}-(\text{CH}_2)_n-$, kde Base je nehalogenovaná různá nukleosidová báze, n je 1 až 7;
 A je karbonyl;
 Z je H nebo OR_3 , kde R_3 je H, C_{1-7} alkyl, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 W je CHR_4OH , kde R_4 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 10 D je dusík; a
 L chybí;

skupina 2, kde

- X je $\text{Base}-(\text{CH}_2)_n-$, kde Base je nehalogenovaná různá nukleosidová báze, n je 1 až 7;
 Y je CHR_2OH , kde R_2 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 15 A je karbonyl nebo CH_2 ;
 Z je H nebo OR_3 , kde R_3 je H, C_{1-7} alkyl, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 W je CHR_4OH , kde R_4 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 D je dusík; a
 L chybí;

20 skupina 3, kde

- X je CHR_2OH , kde R_2 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 Y je $\text{Base}-(\text{CH}_2)_n-$, kde Base je nehalogenovaná různá nukleosidová báze, n je 1 až 7;
 A je CH_2 ;
 Z je OH nebo OR_3 , kde R_3 je H, C_{1-7} alkyl, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 25 W je CHR_4OH , kde R_4 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 D je dusík; a
 L chybí;

skupina 4, kde

- X je $\text{Base}-(\text{CH}_2)_n-$, kde Base je nehalogenovaná různá nukleosidová báze, n je 1 až 7;
 30 Y je COOH nebo CHR_2OH , kde R_2 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 A je karbonyl nebo CH_2 ;
 Z je CH_2 ;
 W je CH_2 ;
 D je dusík; a
 35 L je CHNHR_5 , kde R_5 je H, OH, OR_3 a R_3 je H, C_{1-7} alkyl, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;

skupina 5, kde

- X je CH_2OH , CH_2NH_2 , CONH_2 nebo COOH ;
 Y chybí;
 40 Z je CH_2 nebo $\text{CHO}-\text{L}_1-\text{B}$;
 W je O, S nebo CH_2 ;

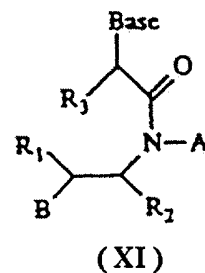
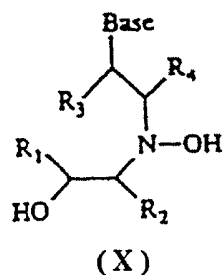
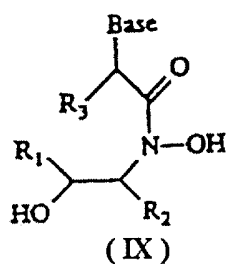
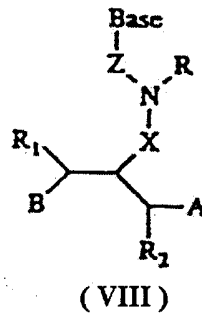
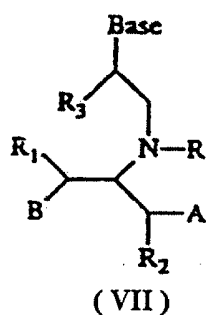
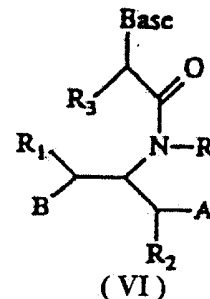
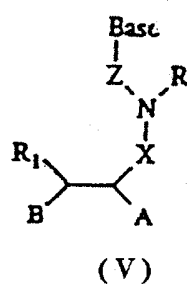
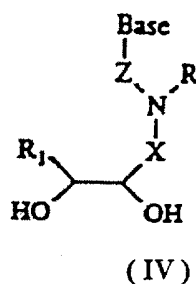
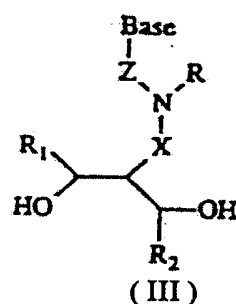
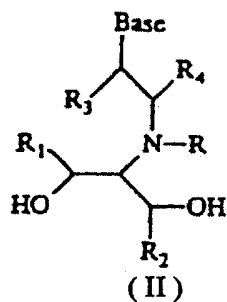
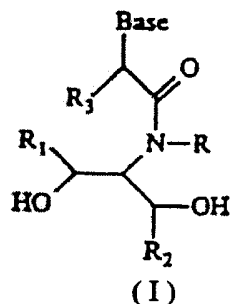
D je CH; a

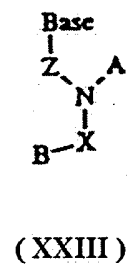
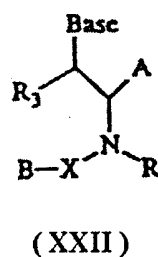
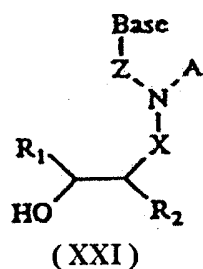
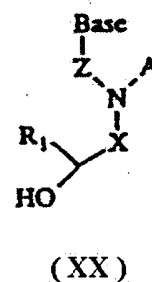
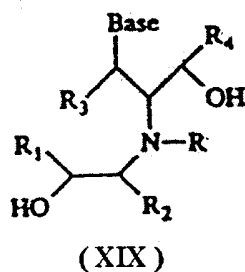
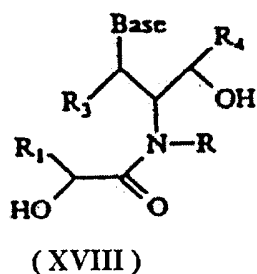
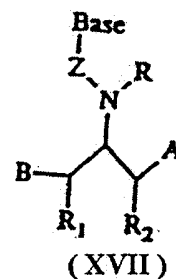
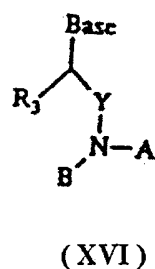
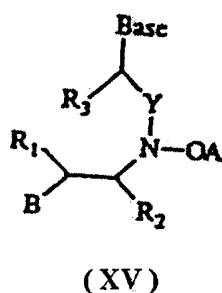
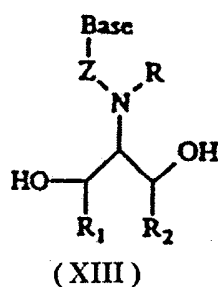
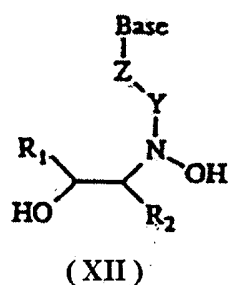
A je COOH, NH₂, nebo L₁-NH-L₂-B, kde B je H nebo nukleosidová báze, a L₁ a L₂ jsou nezávisle (CH₂)_n nebo (CH₂)_nCO, kde n je 0, 1, 2 nebo 3, a

5 L je CHCOOH, CHCH₂COOH, CHNH₂, nebo CH-L₁-NH-L₂-B, kde B je H nebo nukleosidová báze a L₁ a L₂ jsou nezávisle (CH₂)_n nebo (CH₂)_nCO, kde n je 0, 1, 2 nebo 3.

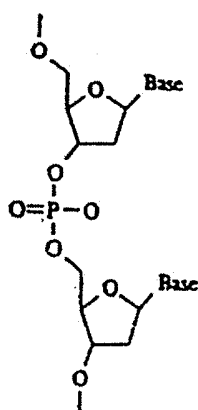
Modifikace nebo jejich funkční ekvivalenty nahrazují cukernou skupinu, která leží mezi základním řetězcem a bázemi, deriváty aminokyselin, například jak je uvedeno ve sloučeninách strukturních vzorců (XXIV) až (XXVI). Předkládané technické řešení také poskytuje nové nukleomonomery a způsoby jejich zabudování do oligomerů, které obsahují nukleomonomery.

10 Technické řešení poskytuje různé nukleomonomerní sloučeniny obecných vzorců (I) až (XXIII).

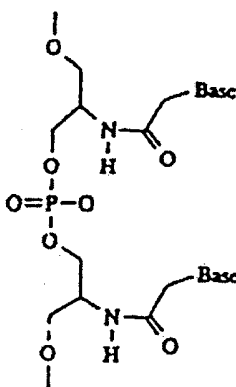




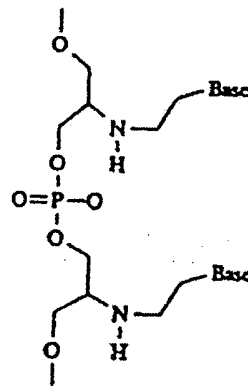
5 Oligomery podle předkládaného technického řešení jsou polymery, které obsahují jeden nebo více monomerních sloučenin připojených tak, že poskytují strukturní analog DNA nebo RNA. Oligomery podle předkládaného technického řešení obsahují dva nebo více nukleomonomerů a mohou obsahovat libovolný počet nukleomonomerů, ačkoliv oligomery o 200 nebo méně nukleomonomerů je obecně snazší syntetizovat. Sloučeniny obecných vzorců (I) až (XXIII) lze připojit jednu k druhé spojkami 4'-5', 3'-5' a 2'-5', jak lze vidět u látek obecných vzorců (XXIV) až (LXIII).



(XXIV)



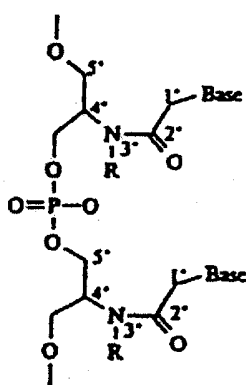
(XXV)



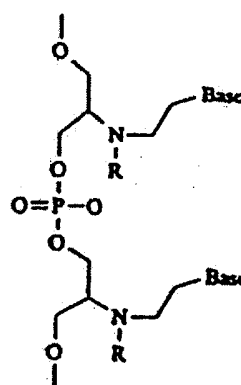
(XXVI)

- Nukleotidové spojky ve sloučeninách podle předkládaného technického řešení jsou vyrobeny z aminokyselin serinu a glycinu nebo jejich derivátů. Oligonukleotidy podle předkládaného technického řešení jsou stabilní *in vivo*, odolné endogenním nukleasám a jsou schopné hybridizace s cílovými nukleotidovými sekvencemi. Příklady sloučenin podle předkládaného technického řešení jsou sloučeniny strukturních vzorců (XXIV) až (LXIII) a jsou konformačně mnohem omezenější ve srovnání s fosfordiesterovými spojkami, které se necházejí v nemodifikované DNA nebo RNA. Toto konformační omezení může, částečně, přispívat k zlepšeným vazebným vlastnostem sloučenin ke komplementárním polynukleotidovým cílovým sekvencím; ale použití technického řešení není závislé na této teorii o zlepšených vazebných vlastnostech.

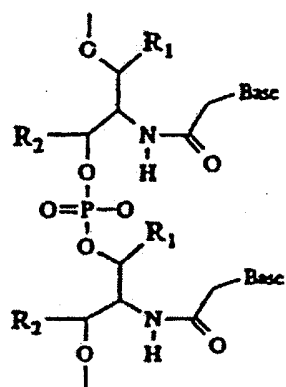
- V dalším provedení je předkládané technické řešení směřováno na modifikované oligonukleotidy nebo jejich deriváty, ve kterých je furanosová skupina přirozeného oligonukleotidu, např. DNA nebo RNA, nahrazena aminokyselinovou / aminoalkoholovou skupinou a další modifikace zahrnuje substituci na aminokyselině v pozicích uvedených v látkách obecných vzorců (XXVII) až (LXIII). Mezinukleotidové spojky mezi sousedními nukleomonomery jsou spojky mezi pozicemi 4' a 5' sousedních nukleomonomerů. Jinak řečeno, fosfordiesterová mezinukleotidová spojka, nebo její funkční ekvivalent, vychází z pozice 5' jednoho nukleomonomeru a připojuje se k pozici 4' sousedního monomeru jak je uvedeno v látkách obecných vzorců (XXIV) až (XLVII):



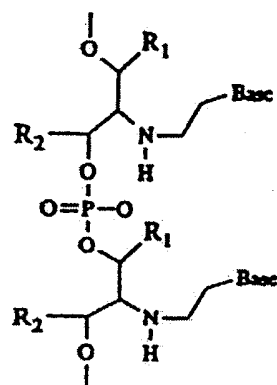
(XXVII)



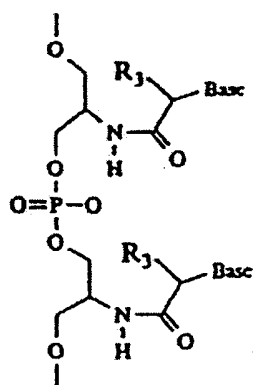
(XXVIII)



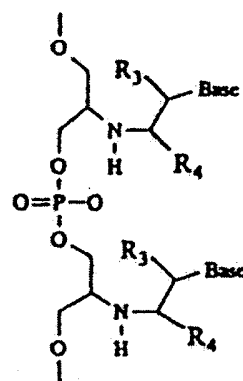
(XXIX)



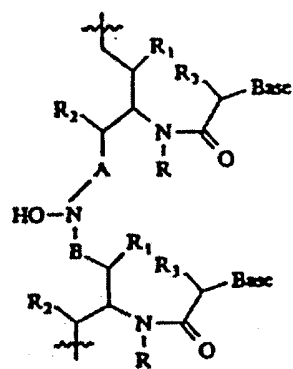
(XXX)



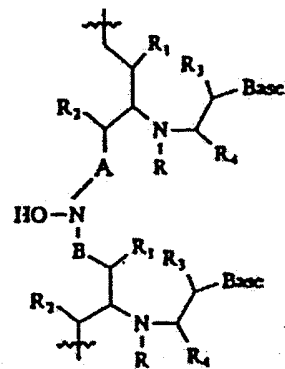
(XXXI)



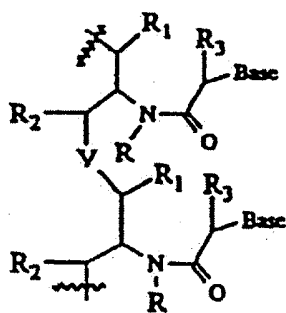
(XXXII)



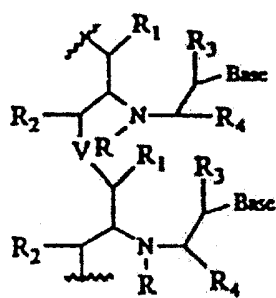
(XXXIII)



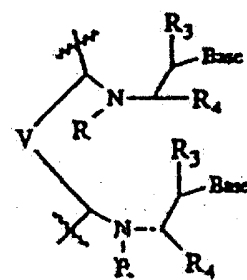
(XXXIV)



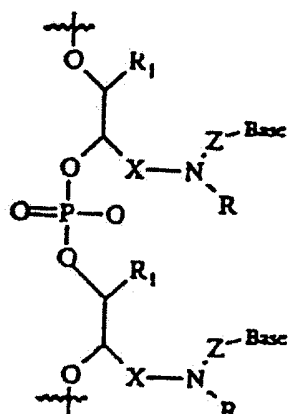
(XXXV)



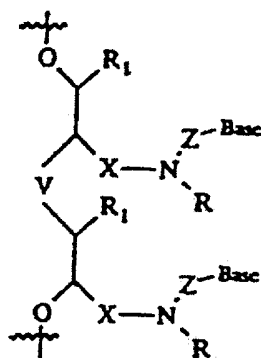
(XXXVI)



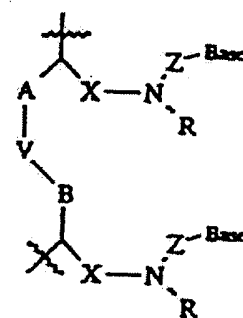
(XXXVII)



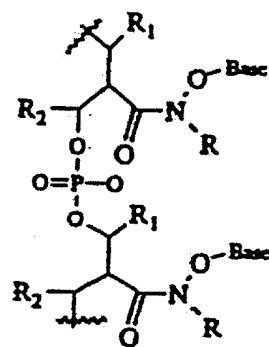
(XXXVIII)



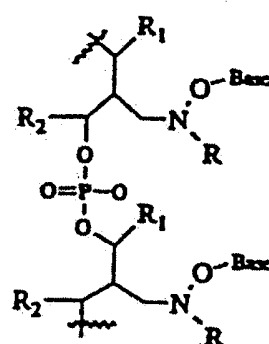
(XXXIX)



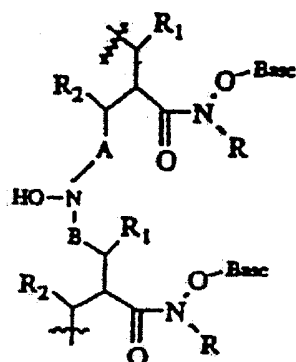
(XL)



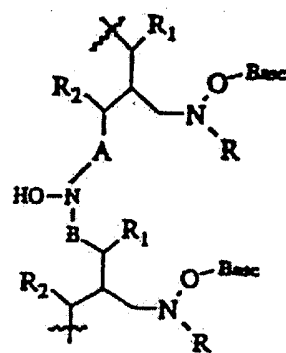
(XLI)



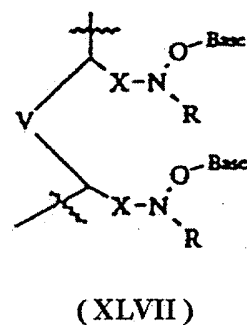
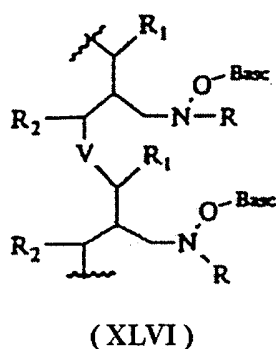
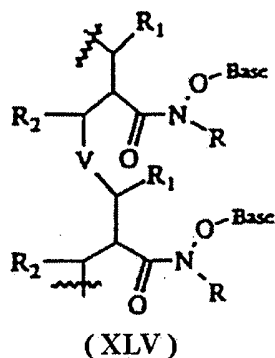
(XLII)



(XLIII)



(XLIV)



Kde každé "R" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

5 Kde každé "Base" je nezávisle nukleosidová báze.

Kde každé "R₁" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

10 Kde každé "R₂" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Kde každé "R₃" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

15 Kde každé "R₄" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Kde každé "A" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃, NR₅ a Se, kde "x" je 1 až 7.

20 Kde každé "B" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃, NR₅ a Se, kde "x" je 1 až 7.

Kde každé "X" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃ a NR₅, kde "x" je 1 až 7.

25 Kde každé "Z" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃ a NR₅, kde "x" je 1 až 7.

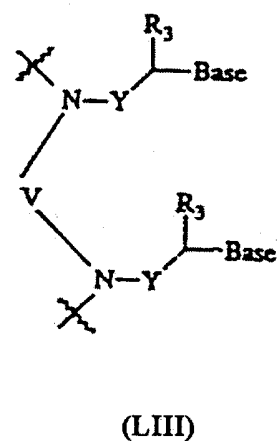
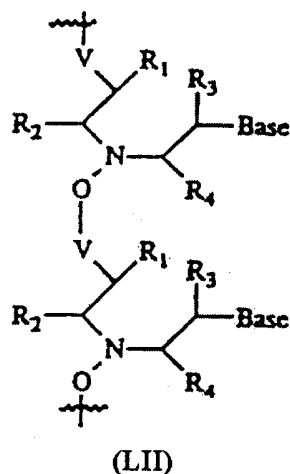
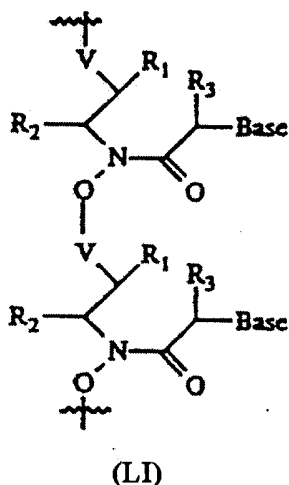
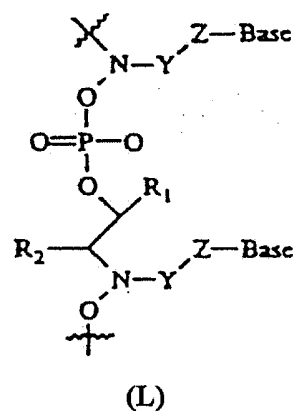
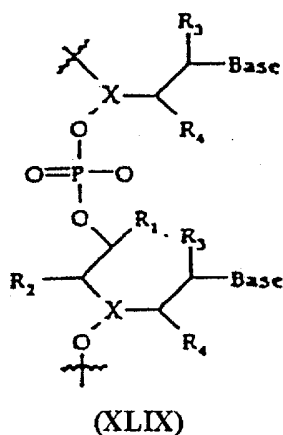
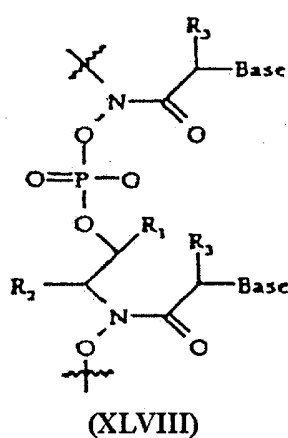
R₅ je H, OH, OMe, CN, NH, NOH, ONCH₃, ONH₂, ethyl, propyl, nižší alkyl (1 až 7 uhlíků), Me, heteroalkyl (1 až 7 uhlíků), aryl (6 až 7 uhlíků), -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je nezávisle H, OH, SH, OCH₃, CN, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

30 Kde každé "V" je nezávisle fosfordiesterový analog, fosforothioát, methylfosfonát, fosfordi-thioát, boronfosfonát, selenfosfonát, fosforoamidát, acetamidát, oxyformamid, oxyacetamid, diisopropylsilyl, karbamát, dimethylensulfid, dimethylensulfoxid, dimethylensulfon a/nebo dva až čtyři atomy dlouhá mezinukleotidová spojka vybraná z uhlíku, dusíku, kyslíku, síry a selenu. Délka oligomeru se může měnit od dimeru až po 200mer nebo delší. Preferované modifikované mezinukleotidové spojky zahrnující struktury určené jako "V" jsou uvedeny v tabulce 1.

35 Navíc lze tyto sloučeniny konjugovat s jedním nebo více konjugáty. Vhodné konjugáty zahrnují O-cholesterol, polyethylenglykol, aminokyseliny, interkalátory, štěpící skupiny (např. imidazol),

zesíťující skupiny, hydroxamáty a fluorescenční značení. Konjugát může být nezávisle místo jednoho nebo více z R, R₁, R₂, R₃, R₄ a R₅.

V dalším provedení poskytuje technické řešení látky obecných vzorců (XLVIII) až (LIII):



5

Ve sloučeninách obecných vzorců (XLVIII) až (LIII) jsou spojky mezi sousedními nukleomonomery 3'-5' spojky.

Kde každé "R" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

10

Kde každé "Base" je nezávisle nukleosidová báze.

Kde každé "R₁" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Kde každé "R₂" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

15

Kde každé "R₃" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

20

Kde každé "R₄" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

5 Kde každé "A" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃, NR₅ a Se, kde "x" je 1 až 7.

Kde každé "B" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃, NR₅ a Se, kde "x" je 1 až 7.

Kde každé "X" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃ a NR₅, kde "x" je 1 až 7.

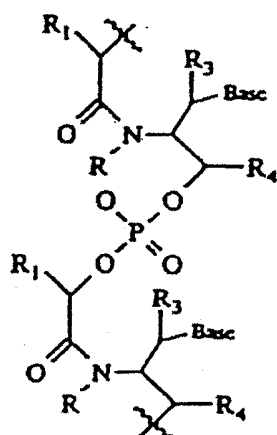
10 Kde každé "Y" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃ a NR₅, kde "x" je 1 až 7.

Kde každé "Z" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃ a NR₅, kde "x" je 1 až 7.

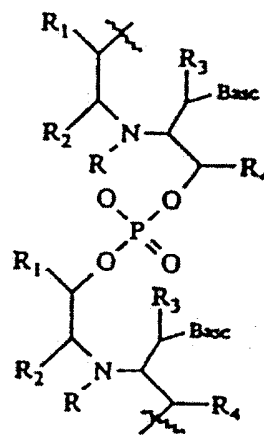
15 R₅ je H, OH, OMe, CN, NH, NOH, ONCH₃, ONH₂, ethyl, propyl, nižší alkyl (1 až 7 uhlíků), Me, heteroalkyl (1 až 7 uhlíků), aryl (6 až 7 uhlíků), -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je nezávisle H, OH, SH, OCH₃, CN, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

20 Kde každé "V" je nezávisle fosfordiesterový analog, fosforothioát, methylfosfonát, fosforodithioát, boronfosfonát, selenfosfonát, fosforoamidát a/nebo dva až čtyři atomy dlouhá mezinukleotidová spojka vybraná z uhlíku, dusíku, kyslíku, síry a selenu. Délka oligomeru se může měnit od dimeru až po 200mer nebo delší. Preferované modifikované mezinukleotidové spojky zahrnující struktury určené jako "V" jsou uvedeny v tabulce 1.

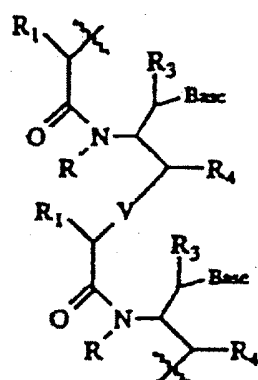
25 Další provedení technického řešení poskytuje oligomery obecných vzorců (LIV) až (LXIII) nebo jejich varianty, které obsahují nové mezinukleotidové spojky, které mají 2'-5' spojky. Tyto oligonukleotidy jsou stabilní *in vivo*, mají zvýšenou odolnost proti endogenním nukleasám a jsou schopné hybridizovat s cílovými oligonukleotidovými sekvencemi.



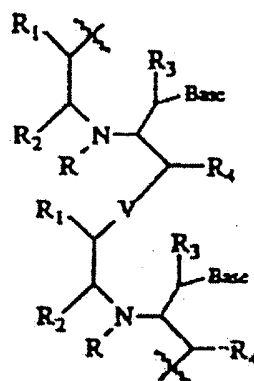
(LIV)



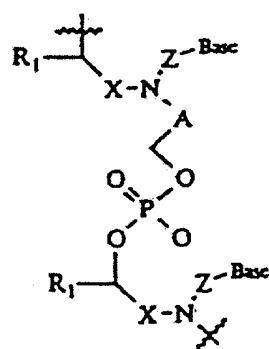
(LV)



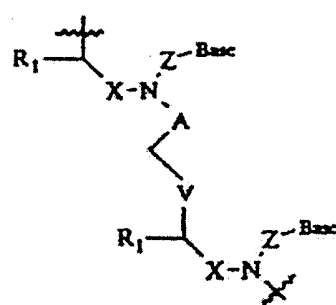
(LVI)



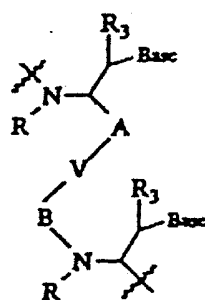
(LVII)



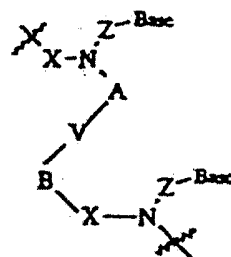
(LVIII)



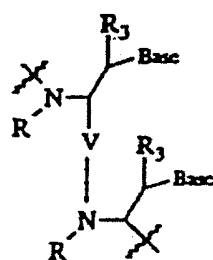
(LIX)



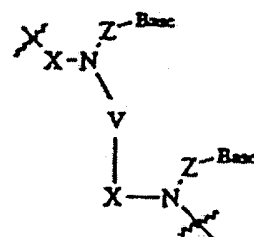
(LX)



(LXI)



(LXII)



(LXIII)

Kde každé "R" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Kde každé "Base" je nezávisle nukleosidová báze.

- 5 Kde každé "R₁" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

- Kde každé "R₂" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, 10 NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Kde každé "R₃" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

- Kde každé "R₄" je nezávisle H, OH, SH, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), Ph, 15 -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je NH₂, SH, OH, COOH, OCH₃, SCH₃, SPh, NOH, NOH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

Kde každé "A" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃, NR₅ a Se, kde "x" je 1 až 7.

- Kde každé "B" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃, NR₅ a Se, kde 20 "x" je 1 až 7.

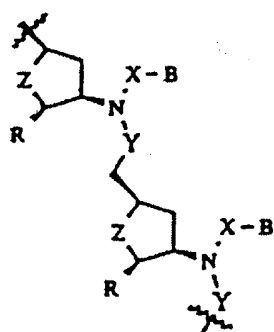
Kde každé "X" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃ a NR₅, kde "x" je 1 až 7.

Kde každé "Z" je nezávisle (CH₂)_x, CO, CS, S, S(O), S(O)(O), NH, NOH, NCH₃ a NR₅, kde "x" je 1 až 7.

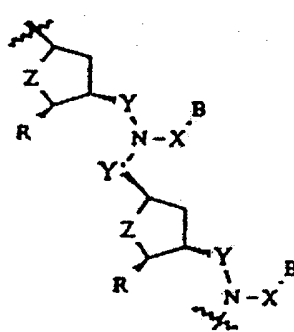
- 25 R₅ je H, OH, OMe, CN, NH, NOH, ONCH₃, ONH₂, ethyl, propyl, nižší alkyl (1 až 7 uhlíků), Me, heteroalkyl (1 až 7 uhlíků), aryl (6 až 7 uhlíků), -(CH₂)_x-F; kde "x" je 1 až 7 a "F" je nezávisle H, OH, SH, OCH₃, CN, SCH₃, ONH₂, ONH(CH₃), SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph.

- Kde každé "V" je nezávisle fosfordiesterový analog, fosforothioát, methylfosfonát, fosfordi-
thioát, boronfosfonát, selenfosfonát, fosforoamidát a/nebo dva až čtyři atomy dlouhá
30 mezinukleotidová spojka vybraná z uhlíku, dusíku, kyslíku, síry a selenu. Délka oligomeru se
může měnit od dimeru až po 200mer nebo delší. Preferované modifikované mezinukleotidové
spojky zahrnující struktury určené jako "V" jsou uvedeny v tabulce 1.

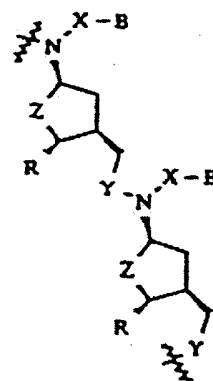
V dalším provedení je předmětem předkládaného technického řešení oligomer obecného vzorce (LXIV) až (LXIX) a jeho monomerní složky obecných vzorců (CXII) až (CXVII).



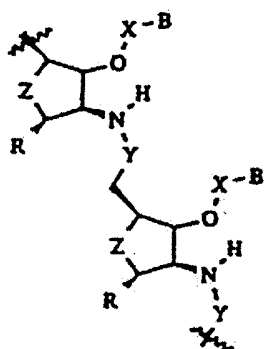
(LXIV)



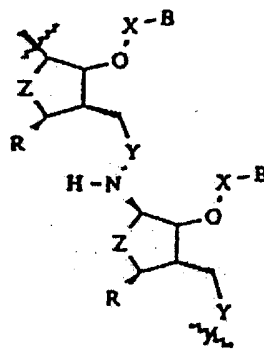
(LXV)



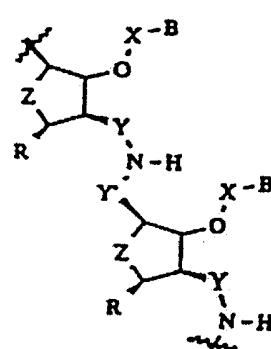
(LXVI)



(LXVII)



(LXVIII)



(LXIX)

kde

X je vybráno ze skupiny sestávající z $(CH_2)_n$, kde n je 1 až 3, $CO(CH_2)_n$, kde n je 0 až 2 a $(CH_2)_nSO_2$, kde n je 1 až 2,

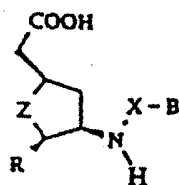
5 Y je vybráno ze skupiny sestávající z CH_2 , CO, COOH, CS a SO_2 ,

Y' je vybráno ze skupiny sestávající z CH_2 , CO, COOH, CS a SO_2 ,

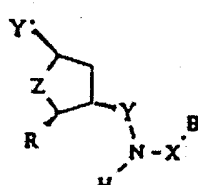
Z je vybráno ze skupiny sestávající z O, S, NH a CH_2 ,

R je vybráno ze skupiny sestávající z CH_2OH , CH_2NH_2 , CH_2NHCHO , $CONH_2$ a COOH,

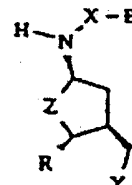
B je nukleosidová báze.



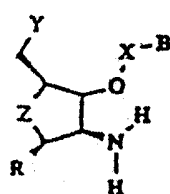
(CXII)



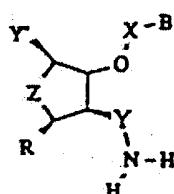
(CXIII)



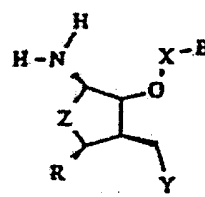
(CXIV)



(CXV)



(CXVI)



(CXVII)

10

kde

X je vybráno ze skupiny sestávající z $(CH_2)_n$, kde n je 1 až 3, $CO(CH_2)_n$, kde n je 0 až 2 a $(CH_2)_nSO_2$, kde n je 1 až 2,

Y je vybráno ze skupiny sestávající z CH_2 , CO, COOH, CS a SO_2 ,

15 Y' je vybráno ze skupiny sestávající z CH_2 , CO, COOH, CS a SO_2 ,

Z je vybráno ze skupiny sestávající z O, S, NH a CH_2 ,

R je vybráno ze skupiny sestávající z CH_2OH , CH_2NH_2 , CH_2NHCHO , $CONH_2$ a COOH,

B je nukleosidová báze.

V dalších provedeních poskytuje předkládané technické řešení způsoby léčení nemocí umožněných přítomností určitých nukleotidových sekvencí, které zahrnují podávání určitého množství modifikovaných oligonukleotidů, které se dokáží specificky vázat k nukleotidové sekvenci, a tak ji inaktivovat, léčenému subjektu.

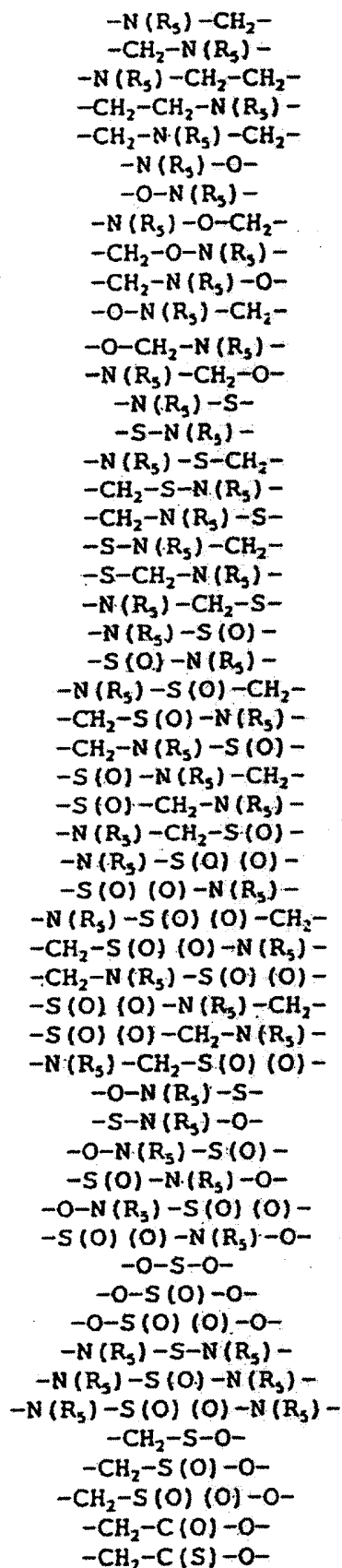
V oligonukleotidech podle předkládaného technického řešení je přinejmenším jedna z fosfordiesterových skupin zahrnutých ve "Vs" ve sloučeninách obecných vzorců (XXIV) až (LXIII) nahrazena modifikovanými mezinukleosidovými spojkami podle předkládaného technického řešení. Je žádoucí, aby bylo více fosfordiesterových spojek v nemodifikovaném oligonukleotidu nahrazeno modifikovanou mezinukleotidovou spojkou, kterou lze ve struktuře použít opakovaně nebo, pokud je to třeba, lze použít různé modifikované mezinukleotidové spojky v jediném oligonukleotidu. V preferovaném provedení oligonukleotidů jsou tyto spojky nechirální tak, aby zvýšily schopnost oligonukleotidu pro hybridizaci k žádanému cíli, ale použitelné jsou i sloučeniny podle předkládaného technického řešení, které zahrnují provedení, ve kterých jsou použity chirální formy.

Preferované modifikované mezinukleotidové spojky, které jsou v uvedených strukturách uvedeny jako "V" jsou uvedeny v následující tabulce 1.

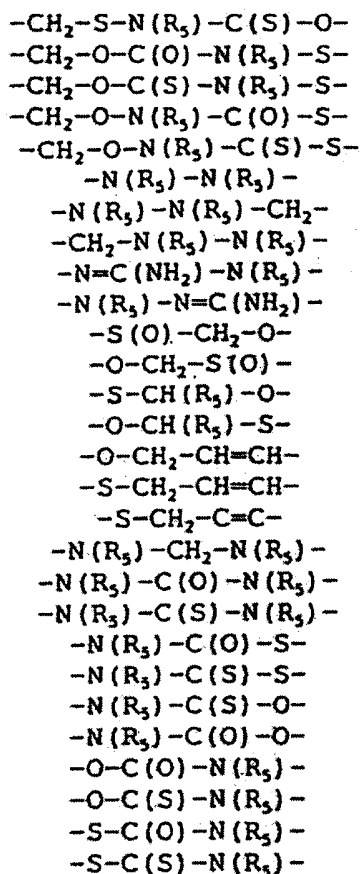
Tabulka 1

-O-
 -S-
 -S(O)-
 -S(O)(O)-
 -Se-
 -Si-
 -C(O)-
 -C(S)-
 -NH-
 -NOH-
 -NCH₃-
 -NR₃-
 -CH₃-
 -O-CH₂-
 -CH₂-O-
 -O-CH₂-CH₂-
 -CH₂-CH₂-O-
 -CH₂-O-CH₂-
 -O-CH₂-O-
 -S-CH₂-
 -CH₂-S-
 -S-CH₂-CH₂-
 -CH₂-CH₂-S-
 -CH₂-S-CH₂-
 -S-CH₂-S-
 -O-CH₂-S-
 -S-CH₂-O-
 -S(O)-CH₂-
 -CH₂-S(O)-

$-S(O)-CH_2-CH_2-$
 $-CH_2-CH_2-S(O)-$
 $-CH_2-S(O)-CH_2-$
 $-S(O)-CH_2-S(O)-$
 $-O-CH_2-S(O)-$
 $-S(O)-CH_2-O-$
 $-S(O)(O)-CH_2-$
 $-CH_2-S(O)(O)-$
 $-S(O)(O)-CH_2-CH_2-$
 $-CH_2-CH_2-S(O)(O)-$
 $-CH_2-S(O)(O)-CH_2-$
 $-S(O)(O)-CH_2-S(O)(O)-$
 $-O-CH_2-S(O)(O)-$
 $-S(O)(O)-CH_2-O-$
 $-S-S-$
 $-S(O)-S(O)-$
 $-S(O)(O)-S(O)-(O)-$
 $-Se-CH_2-$
 $-CH_2-Se-$
 $-Se-CH_2-CH_2-$
 $-CH_2-CH_2-Se-$
 $-CH_2-Se-CH_2-$
 $-Se-CH_2-Se-$
 $-O-CH_2-Se-$
 $-Se-CH_2-O-$
 $-Se(O)-CH_2-$
 $-CH_2-Se(O)-$
 $-Se(O)-CH_2-CH_2-$
 $-CH_2-CH_2-Se(O)-$
 $-CH_2-Se(O)-CH_2-$
 $-Se(O)-CH_2-Se(O)-$
 $-O-CH_2-Se(O)-$
 $-Se(O)-CH_2-O-$
 $-Se(O)(O)-CH_2-$
 $-CH_2-Se(O)(O)-$
 $-Se(O)(O)-CH_2-CH_2-$
 $-CH_2-CH_2-Se(O)(O)-$
 $-CH_2-Se(O)(O)-CH_2-$
 $-Se(O)(O)-CH_2-Se(O)(O)-$
 $-Se-Se-$
 $-Se(O)-Se(O)-$
 $-Se(O)(O)-Se(O)-(O)-$
 $-O-CH_2-Se(O)(O)-$
 $-Se(O)(O)-CH_2-O-$
 $-S-CH_2-Se-$
 $-Se-CH_2-S-$
 $-S(O)-CH_2-Se(O)-$
 $-Se(O)-CH_2-S(O)-$
 $-S(O)(O)-CH_2-Se(O)(O)-$
 $-Se(O)(O)-CH_2-S(O)(O)-$
 $-S-S-$
 $-S(O)-S(O)-$
 $-S(O)(O)-S(O)(O)-$
 $-Se-Se-$
 $-Se(O)-Se(O)-$
 $-Se(O)(O)-Se(O)(O)-$



$$\begin{aligned}
& -CH_2-N(R_5)-C(O)-O- \\
& -CH_2-N(R_5)-C(S)-O- \\
& -N(R_5)-C(O)-O-CH_2- \\
& -N(R_5)-C(S)-O-CH_2- \\
& \quad -O-C(O)-N(R_5)-O- \\
& \quad -O-C(S)-N(R_5)-O- \\
& -O-C(O)-N(R_5)-CH_2- \\
& -O-C(S)-N(R_5)-CH_2- \\
& \quad -O-C(O)-CH_2-N(R_5)- \\
& \quad -O-C(S)-CH_2-N(R_5)- \\
& -O-C(O)-CH_2-O-N(R_5)- \\
& -O-C(S)-CH_2-O-N(R_5)- \\
& -O-C(O)-N(R_5)-O-CH_2- \\
& -O-C(S)-N(R_5)-O-CH_2- \\
& -O-N(R_5)-C(O)-O-CH_2- \\
& -O-N(R_5)-C(S)-O-CH_2- \\
& -CH_2-O-C(O)-N(R_5)-O- \\
& -CH_2-O-C(S)-N(R_5)-O- \\
& -CH_2-O-C(O)-N(R_5)-CH_2- \\
& -CH_2-O-C(S)-N(R_5)-CH_2- \\
& -CH_2-O-C(O)-CH_2-N(R_5)- \\
& -CH_2-O-C(S)-CH_2-N(R_5)- \\
& \quad -CH_2-O-C(O)-N(R_5)- \\
& \quad -CH_2-O-C(S)-N(R_5)- \\
& -CH_2-O-C(O)-N(R_5)-O- \\
& -CH_2-O-C(S)-N(R_5)-O- \\
& -CH_2-O-N(R_5)-C(O)-O- \\
& -CH_2-O-N(R_5)-C(S)-O- \\
& -CH_2-N(R_5)-C(O)-S- \\
& -CH_2-N(R_5)-C(S)-S- \\
& -N(R_5)-C(O)-S-CH_2- \\
& -N(R_5)-C(S)-S-CH_2- \\
& \quad -S-C(O)-N(R_5)-O- \\
& \quad -O-C(S)-N(R_5)-S- \\
& -S-C(O)-N(R_5)-CH_2- \\
& -S-C(S)-N(R_5)-CH_2- \\
& -S-C(O)-CH_2-N(R_5)- \\
& -S-C(S)-CH_2-N(R_5)- \\
& -S-C(O)-CH_2-O-N(R_5)- \\
& -O-C(S)-CH_2-S-N(R_5)- \\
& -O-C(O)-N(R_5)-S-CH_2- \\
& -S-C(S)-N(R_5)-O-CH_2- \\
& -S-N(R_5)-C(O)-O-CH_2- \\
& -O-N(R_5)-C(S)-S-CH_2- \\
& -CH_2-S-C(O)-N(R_5)-O- \\
& -CH_2-O-C(S)-N(R_5)-S- \\
& -CH_2-S-C(O)-N(R_5)-CH_2- \\
& -CH_2-S-C(S)-N(R_5)-CH_2- \\
& -CH_2-S-C(O)-CH_2-N(R_5)- \\
& -CH_2-S-C(S)-CH_2-N(R_5)- \\
& \quad -CH_2-S-C(O)-N(R_5)- \\
& \quad -CH_2-S-C(S)-N(R_5)- \\
& -CH_2-S-C(O)-N(R_5)-O- \\
& -CH_2-S-C(S)-N(R_5)-O- \\
& -CH_2-S-N(R_5)-C(O)-O-
\end{aligned}$$



5 R_5 je H, OH, OMe, CN, NH, NOH, ONCH₃, ONH₂, ethyl, propyl, nižší alkyl (1 až 7 uhlíků), Me, heteroalkyl (1 až 7 uhlíků), aryl (6 až 7 uhlíků), $-(\text{CH}_2)_x-\text{F}$; kde "x" je 1 až 7 a "F" je nezávisle H, OH, SH, OCH₃, CN, SCH₃, ONH₂, ONH(CH)₃, SNH₂, S(O)NH₂, S(O)(O)NH₂, CH₃, Ph. Navíc lze ke spojce připojit jeden nebo více konjugátů tak, že vznikne oligomerní konjugát. Vhodné konjugáty jsou O-cholesterol, polyethylenglykol, aminokyseliny, interkalátory, štěpicí skupiny (např. imidazol), zesilující skupiny (např. psoralen), lipidy, peptidy, alkylační činidla, hydroxamáty a fluorescenční značení.

10 Zejména preferované 4'-5' spojky zahrnují fosfordiester, fosforothioát, methylfosfonát, karboxamid, thiokarboxamid, hydroxamát, sulfonamid, hydroxylamin a karbamát. Tytéž modifikace jsou preferovány pro 2'-5' a 3'-5' spojky.

15 Oligomery podle předkládaného technického řešení nejsou omezeny na oligomery s homogenními spojkami a do technického řešení jsou zahrnuty i ty s alternujícími nebo náhodně distribuovanými spojkami včetně 2', 5' spojek. Protože oligomery podle předkládaného technického řešení lze syntetizovat tak, že se připojuje v jednom momentě pouze jeden nukleomonomer, lze každou jednotlivou spojku a/nebo substituční spojku a povahu každé jednotlivé "báze" volit nezávisle, a tak vyrobit oligonukleotidy žádané sekvence.

20 Oligomery podle předkládaného technického řešení mohou obsahovat jakýkoliv žádaný počet substitučních spojek. Tyto substituční mohou být shodné nebo rozdílné na základě provedení vybraných za "V" včetně jiných substitučních spojek nezahrnutých v předkládaném technickém řešení. Protože se oligomery připravují postupně, lze použít jakýkoliv typ spojky nebo substituční spojky, báze a cukerné modifikace.

25 V preferovaném provedení předkládaného technického řešení substituční spojky podle předkládaného technického řešení pravidelně alternují. Například jedna substituční spojka je následována dvěma fosfordiesterovými spojkami a jednou substituční spojkou podle předkládaného

technického řešení, atd. Další provedení zahrnují, například alternující spojky jako je substituční spojka následovaná fosfordiesterovým analogem (např. thioát, atd.), substituční spojkou podle předkládaného technického řešení, fosfordiesterovým analogem, atd., tj. oligomer podle předkládaného technického řešení obsahuje jednu po druhé alternaci dvou typů substitučních spojek. Oligomery podle předkládaného technického řešení, které obsahují více než jeden typ spojky mohou mít jakýkoliv počet typů alternací tvořených střídáním různých typů spojek mezi podjednotkami oligomeru.

Cukerné modifikace lze provést na jednom nebo více nukleomonomerních zbytcích v oligomerech podle předkládaného technického řešení, ale 4'-5', 3'-5' a 2'-5' nukleotidová spojka mezi aminokyselinovými zbytky je, v případě provedení takových modifikací, preferována. Pokud se jedná o tento případ, lze pro popis sekvence bází oligonukleotidového analogu použít další zkratky. Například, ve standardní DNA (nebo RNA) jsou sekvence obecně označovány sekvencí bází, jako, například ATG CGC TGA. Obecně, je jednoduše předem řečeno, zda se jedná o sekvence RNA nebo DNA. Odpovídající notace je v předkládaném technickém řešení použita tak, že popisuje oligonukleotidové analogy s danou sekvencí bází.

Další modifikace nukleomonomerů:

Oligomery podle předkládaného technického řešení také zahrnují různé modifikace vedle substitučních spojek podle předkládaného technického řešení. Další modifikace zahrnují oligomery, ve kterých (i) jeden nebo více nukleomonomerních zbytků je modifikováno v polohách 2', 3', 4' a 5', (ii) je zahrnuta jedna nebo více kovalentně zesilujících skupin, (iii) jsou zahrnuty jiné substituční spojky než ty podle předkládaného technického řešení, (iv) jsou zahrnuty jiné analogy bází jako je 8-oxo-N⁶-methyladenin a (v) jsou zahrnuty konjugáty jako jsou interkalátory nebo polylysin tak, že zvýší vazebnou afinitu k cílové sekvenci nukleové kyseliny nebo zlepší asociaci oligomeru s buňkami.

Sekvenčně specifické polynukleotidové vazebné vlastnosti oligomeru podle předkládaného technického řešení pro jednovláknové a dvojitě vláknové cíle jsou kompatibilní s dalšími modifikacemi oligomeru. Tyto další modifikace propůjčují jiné vhodné vlastnosti jako je stabilita proti štěpení nukleasami (např. v části oligomeru podle předkládaného technického řešení, která obsahuje fosfordiesterové vazby) nebo zlepšuje jejich schopnost procházet buněčnou membránou a podobně.

Oligomery podle předkládaného technického řešení obsahují jednu nebo více substitučních spojek jako je sulfidová nebo sulfonová spojka (Benner, S.A., Mezinárodní publikační č. WO 89/12060), sulfamátová spojka (Mezinárodní publikační č. WO 91/15500), karbamátová nebo jiné substituční spojky (Stirchak, E.P., a kol. *Nucleic Acids Res.*, 1989, **17**, 6129-6141; Summerton, J., a kol. Mezinárodní publikační č. WO 216 860) a příbuzné spojky.

Provedení oligomerů podle předkládaného technického řešení zahrnuje oligomery, které mají (1) přinejmenším jednu substituční spojkou a aminokyselinu, která je připojena k sousedním monomerům a (2) jednu nebo více substitučních spojek, které nejsou předmětem předkládaného technického řešení, vybraných ze skupiny sestávající z fosforothioátu, methylfosfonátu a thionomethylfosfonátu a/nebo (3) jednu nebo více fosfordiesterových spojek a/nebo (4) purinové nebo pyrimidinové analogy, které zlepšují vazebnou afinitu ke komplementární cílové sekvenci. Jiné oligomery zahrnují (1) oligomer, který má substituční spojkou podle předkládaného technického řešení na 3' a/nebo 5' koncích a fosforothioátovou spojkou všude jinde; (2) oligomery, které mají substituční spojkou podle předkládaného technického řešení a standardní purinové nebo pyrimidinové báze (např. adenin, guanin, cytosin, thymin nebo uracil); (3) oligomery, které mají substituční spojkou podle předkládaného technického řešení a jednu nebo více bází, která zlepšuje vazebnou afinitu nebo průchodnost oligomeru (např. 5-methylcytosin, 5'-(1-propynyl)-uracil, 5-(1-propynyl)cytosin). Také jsou zahrnuty oligomery, které obsahují nukleomonomerní zbytky, které jsou spojené přes hydroxamáty.

Syntéza oligomerů:

Oligomery podle předkládaného technického řešení lze vyrobit pouze z nukleomonomerů podle předkládaného technického řešení nebo v kombinaci s běžnými nukleomonomery a syntetizovat pomocí standardních technik pro syntézu oligomerů na pevné fázi (nebo v roztoku), které jsou nyní komerčně dostupné. Obecně, oligomery podle předkládaného technického řešení se syntetizují způsobem, který zahrnuje kroky: syntéza nukleomonomerního nebo oligomerního synthonu, který má chránicí skupinu, bázi a skupinu, která je schopna připojení k nukleomonomeru nebo oligomeru; připojení nukleomonomerních nebo oligomerního synthonu k akceptorovému nukleomonomeru nebo oligomeru; odstranění chránicí skupiny; a opakování celého cyklu podle potřeby dokud není syntetizován požadovaný oligomer.

Oligomery podle předkládaného technického řešení mohou mít jakoukoliv délku včetně délky větší než je 40, 50, 100, 200 nebo 500 nukleomonomerů. Obecně, preferované oligomery obsahují 2 až 30 nukleomonomerů. Délky rovné nebo větší než 8 až 20 nukleomonomerů lze využít pro terapeutické nebo diagnostické účely pokud mají vhodnou sekvenci bází. Krátké oligomery, které obsahují 2, 3, 4 nebo 5 nukleomonomerů jsou také zahrnuty v předkládaném technickém řešení a lze je použít jako synthony.

Oligomery, které mají náhodnou sekvenci a obsahují 6, 7 nebo 8 nukleomonomerů lze použít jako primery při klonování nebo zmnožování, které využívají primery s náhodnou sekvencí, za toho předpokladu, že oligomer obsahuje 1 nebo 2 zbytky na 3' konci, které mohou sloužit jako primery pro polymerasy nebo reversní transkriptasy a které jinak neinterferují s polymerasovou aktivitou.

Kromě popsaných spojek mohou oligomery podle předkládaného technického řešení obsahovat běžné fosfordiesterové spojky nebo mohou obsahovat jiné substituční spojky jako fosforamiditové spojky navíc k substitučním spojkám podle předkládaného technického řešení. Tyto substituční spojky zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny, provedení, ve kterých skupina --O--P(O)(S)--O-- ("fosforothioát"), $\text{--O--P(O)(NR}_2^{11})\text{--X}^2$, $\text{--O--P(O)(R}^{11})\text{--O--}$, $\text{--O--P(S)(R}^{11})\text{--O--}$ ("thionoalkylfosfonát"), $\text{--P(O)(OR}^9\text{)--X}^2$ nebo $\text{--O--C(O)(NR}_2^{11})\text{--X}^2$, ve které R^{11} je H (nebo sůl) nebo alkyl (1 až 12 uhlíků včetně methylu a ethylu) a R^9 je alkyl (1 až 9 uhlíků) a spojka je připojena k sousedním nukleomonomerům přes --O-- nebo --S-- vázané k uhlíku nukleomonomerů a X^2 je O nebo S. Fosforothioátová a fosfordiesterová spojka jsou dobře známy. Zejména preferované substituční spojky pro použití v oligomerech podle předkládaného technického řešení zahrnují fosfordiesterové, fosforothioátové, methylfosfonátové a thionomethylfosfonátové substituční spojky. Fosforothioátové a methylfosfonátové substituční spojky, které zvyšují stabilitu oligomeru by měly být identické, zejména preferované oligomery podle předkládaného technického řešení obsahují jednu nebo více fosforothioátových nebo methylfosfonátových substitučních spojek.

Oligomery podle předkládaného technického řešení a jejich části lze syntetizovat pomocí způsobů, které jsou odborníkům na danou problematiku známy. Syntetické postupy známy v daném oboru a popsané v předkládaném technickém řešení lze použít pro syntézu oligomerů, které obsahují substituční spojky podle předkládaného technického řešení, stejně jako jiné spojky nebo substituční spojky známy v dané problematice, za použití vhodně chráněných nukleomonomerů. Způsoby syntézy oligomerů, které obsahují spojky obsahující fosfor, lze nalézt například v pracích Froehler, B., a kol., *Nucleic Acids Res.*, 1986, 14, 5399-5467; *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16, 4831-4839; *Nucleosides & Nucleotides*, 1987, 6, 287-291; Froehler, B., *Tetrahedron Letts.*, 1986, 27, 5575-5578; Caruthers, M.H., *Oligodeoxynucleotides Antisense Inhibitions of Gene Expression*, 1989, J.S. Cohen, editor, CRC Press, Boca Raton, str. 7 až 24; Reese, C.B., a kol., *Tetrahedron Letts.*, 1985, 26, 2245-2248. Syntéza methylfosfonátem spojených oligomerů přes methylfosfonoamidit již byla také popsána (Agrawal, S., a kol., *Tetrahedron Letts.*, 1987, 28, 3539-3542; Klem, R.E., a kol., Mezinárodní publikační č. WO 92/07864.

Oligomery obsahující spojky podle předkládaného technického řešení jsou také běžně syntetizovány tak, že se připravují dimery nebo trimery syntézou v roztoku a následuje převedení

synthonu na derivát, který je zabudován do oligomerů buď syntézou na pevné fázi nebo v roztoku. Typické synthony jsou 5' DMT nebo MMT blokované 3' fosfonátové nebo fosforamiditové deriváty, které jsou připravovány standardními postupy (viz: Gait, M.J., editor, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, 1984, IRL Press, Oxford).

- 5 Synthony, které patří do rámce předkládaného technického řešení, zahrnují dimery, trimery, tetramery, hexamery a delší oligomery vyrobené syntézou na pevné fázi nebo v kapalině. Trimery a delší synthony mohou obsahovat více než jeden typ spojky. Synthony mohou obsahovat jakoukoliv popsanou bázi nebo 2', 3', 4' a 5' skupiny jako je OH, DMTO, MMTO, O-allyl, fosfát, fosfonát nebo amidit, které již byly popsány.
- 10 Ribosa-amidové oligonukleotidy lze syntetizovat v podmínkách standardní peptidové syntézy na pevné fázi (Fmoc chemie) (viz obrázek 26).

Blokující skupiny pro syntézu sloučenin podle předkládaného technického řešení:

1. Spojující skupiny

- 15 Vhodné spojující skupiny jsou, například, H-fosfonát, methylfosfonamidit nebo fosforamidit. Fosforamidity, které lze použít zahrnují β -kyanoethylfosforamidity (které jsou preferovány). Lze také použít methylfosfonamidity a alkylfosfonamidity (včetně ethylfosfonamiditů a propylfosfonamiditů). Příklady fosforamiditů jsou uvedeny na obecných vzorcích (I) až (XXI).

- 20 Vhodné "spojující skupiny" v pozicích 2', 3', 4' nebo 5' pro syntézu oligomeru přes fosforamiditový triester, která je v tomto dokumentu označována jako "amiditová" chemie, zahrnují N,N-diisopropylamino- β -kyanoethoxyfosfin, N-diisopropylamino-methoxyfosfin, N,N-diethylamino-kyanoethoxyfosfin a (N-morfolin)-methoxyfosfin (Moore, M.F., a kol., *J. Org. Chem.*, 1985, 50, 2019-2025; Uznanski, A.W., a kol., *Tetrahedron Letts.*, 1987, 28, 3401-3404; Bjergarde, K., a kol., *Nucl. Acids Res.*, 1991, 19, 5843-5850; Dahl, O., *Sulfur Reports*, 1991, 11, 167-192). Pro přípravu methylfosfonátů lze použít i příbuzné spojující skupiny jako
- 25 jsou N,N-diisopropylamino-methyl-fosfin nebo N,N-diethylamino-methylfosfin. Methylfosfonátové oligomery lze běžně syntetizovat pomocí spojujících skupin jako je N,N-diisopropylamino-methylfosforamidit. Syntézu nukleomonomerních amiditů podle předkládaného technického řešení lze provést běžnými postupy (například Gryaznov, S.M., a kol., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 1879-1882; Vinayak, R., a kol., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 1265-1269;
- 30 Sinha, N.D., a kol., *Nucl. Acids Res.*, 1984, 12, 4539-4557; a další reference citované v tomto dokumentu).

2. Chránicí skupiny

- 35 Pro chránění exocyklického dusíku cytosinu, adeninu nebo guaninu lze použít chránicí skupiny jako je diisobutylformamidin, benzoyl, isobutyryl, Fmoc, dialkylforamidin, dialkylacetamidin nebo jiné skupiny známé v dané problematice. Alternativně lze cytidin přímo zabudovat do oligomerů bez chránicí skupiny na exocyklickém dusíku pomocí popsaných způsobů (Gryaznov, S.M., a kol., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 5876-5877; Gryaznov, S.M., a kol., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 1879-1882; Kung, P.-P., a kol., *Tetrahedron Letts*, 1992, 33, 5869-5872).

- 40 Vhodné chránicí skupiny jsou Bz (benzoyl), DMT (dimethoxytrityl), MMT (monomethoxytrityl) nebo Fmoc v pozici 5' a/nebo TBS, hydrogenfosfonát, methylfosforamidit, methylfosfonamidit, β -kyanoethylfosforamidit na 3' konci. Nicméně umístění blokujících skupin lze obrátit podle potřeby (např. fosforamidit na 5' konci a DMT na 3' konci). Obecně lze nukleomonomery a oligomery podle předkládaného technického řešení derivatizovat takovými "blokujícími skupinami", jaké jsou uvedeny v příslušných obecných vzorcích, způsoby známými v dané
- 45 problematice.

Konjugáty:

Předmět předkládaného technického řešení také poskytuje "konjugáty oligomerů podle předkládaného technického řešení. "Konjugáty" běžných oligomerů jsou odborníkům známy. Například, oligomery podle předkládaného technického řešení lze kovalentně připojit k různým

skupinám jako jsou, například, interkalátory a sloučeniny, které interagují specificky s malým žlábkem dvojšroubovice DNA. Další skupiny pro konjugaci k oligomerům podle předkládaného technického řešení zahrnují značení (např. radioaktivní, fluorescenční, enzymové) nebo skupiny, které usnadňují spojení s buňkou pomocí odštěpitelných spojek a podobně. Vhodné radioznačení zahrnuje ^{31}P , ^{35}S , ^3H , ^{131}I a ^{14}C ; a vhodné fluorescenční značení zahrnuje fluorescein, resorufin, rhodamin, BODIPY (Molekulové sondy) a texaskou červen; vhodné enzymy zahrnují alkalickou fosfatase a křenuvou peroxidase. Jiné sloučeniny, které lze použít jako kovalentně připojené skupiny k oligomerům podle předkládaného technického řešení zahrnují biotin, protilátky nebo fragmenty protilátek, asialoglykoprotein, transferrin a HIV Tat protein.

Tyto přídatné skupiny lze derivatizovat jakoukoliv běžnou skupinou. Například, interkalátory, jako je akridin nebo psoralen lze připojit k oligomerům podle předkládaného technického řešení přes jakoukoliv volnou $-\text{OH}$ nebo $-\text{SH}$ skupinu, např. v koncové pozici 5' oligomeru, 2' pozici RNA nebo OH , NH_2 , COOH nebo SH zavedenou do pozice 5 pyrimidinů. Běžná je derivatizovaná forma, která obsahuje, například, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ nebo $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ v pozici 5 pyrimidinů. Konjugáty, které obsahují polylysin nebo lysin lze syntetizovat již popsáním způsobem a lze tak dále zlepšit vazebnou afinitu oligomeru k jeho cílové sekvenci nukleové kyseliny (Lemaitre, M., a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 648-352; Lemaitre, M., a kol., *Nucleosides and Nucleotides*, 1987, 6, 311-315).

Lze připojit širokou škálu substituentů včetně těch, které lze připojit přes spojky nebo substituční spojky. $-\text{OH}$ skupiny v oligomerech lze nahradit fosfáty chráněnými běžnou chránicí skupinou nebo spojujícími skupinami čímž se vytvoří další spojky k jiným nukleomonomerům nebo je lze vázat ke konjugovaným substituentům. 5' koncovou OH lze fosforylovat; 2' $-\text{OH}$ nebo OH na 3' konci lze také fosforylovat. Hydroxyly lze také derivatizovat pomocí běžných chránicích skupin.

Oligomery podle předkládaného technického řešení lze kovalentně derivatizovat skupinami, které usnadňují spojení s buňkou pomocí odštěpitelných spojek. Vhodné konjugáty také zahrnují pevnou fázi pro syntézu oligomerů a usnadňují detekci sekvencí nukleové kyseliny. Pevné fáze zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny, silikagel, porézní sklo a polystyren.

Cukerné modifikace:

Derivatizaci lze provést náhradou v cukru. Mezi preferované deriváty oligomerů podle předkládaného technického řešení patří 2'-O-allyl nebo 3'-O-allyl skupiny, které zlepšují průchodnost a stabilitu proti odbourávání nukleasami, ale nesnižují afinitu oligomeru k jednovláknovým nebo dvojitým cílům. Zejména v oligonukleotidech s ribos-amidovým základním řetězcem lze pro zlepšení farmakokinetických vlastností těchto oligonukleotidů zavést různé skupiny v pozicích 1', 2', 3', 4' a 5' ribosy.

Substituční spojky:

Oligomery podle předkládaného technického řešení také obsahují navíc k 2'-5', 3'-5' a 4'-5' spojkám běžně známým v dané problematice jednu nebo více "substitučních spojek" popsanych v tomto dokumentu. Tyto "substituční spojky" zahrnují fosforothioát, methylfosfonát, thionomethylfosfonát, fosforodithioát, alkylfosfonáty, morfolinosulfamid, boranofosfát ($-\text{O}-\text{P}(\text{OCH}_3)(\text{BH}_3)-\text{O}-$), siloxan ($-\text{O}-\text{Si}(\text{X}^4)(\text{X}^4)-\text{O}-$; X^4 je 1 až 6 uhlíků alkyl nebo fenyl) a fosforamidát (methoxyethylamin ($-\text{O}-\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)(\text{O})-\text{O}-$) a podobně) a jsou syntetizovány způsoby, které jsou popsány v literatuře včetně následujících referencí (Sood, A., a kol., *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 9000-9001; WO 91/08213; WO 90/15065; WO 91/15500; Stirchak, E.P., a kol., *Nucleic Acid Res.*, 1989, 17, 6129-6141; U.S. Patent 5, 034,506; U.S. Patent 5,142,047; Hewitt, J.M., a kol., *Nucleosides & Nucleotides*, 1992, 11, 1661-1666; Summerton, J., a kol., Mezinárodní publikační č. 216 860). Substituční spojky, které lze použít v oligomerech popsanych v předkládaném technickém řešení také zahrnují sulfonamid ($-\text{O}-\text{SO}_2-\text{NH}$), sulfid ($-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$), sulfonát ($-\text{O}-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$), karbamát ($\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$), dimethylhydrazin ($-\text{CH}_2-\text{NCH}_3-$), sulfamát ($-\text{O}-\text{S}(\text{O})(\text{O})-\text{N}-$; $-\text{N}-\text{S}(\text{O})(\text{O})-\text{N}-$), 3'-amin ($-\text{NH}-\text{CH}_2$), N-methylhydroxylamin ($-\text{CH}_2-\text{NCH}_3-\text{O}-$) a 2', 5' spojky (jako je 2', 5' karbamát (2'-N(H)-C(O)-O-5'), 5', 2' karbamát (2'-O-C(O)-N(H)-5'), 5', 2' methylkarbamát (2'-O-C(O)-

$N(CH_3)-5'$) a $5'$, $2'$ thioformacetal ($2'-O-CH_2-S-5'$). Další vhodné substituční spojky zahrnují amidové spojky popsané v Buchardt, O. a kol. (Mezinárodní publikační č. WO 92/20702) a spojky popsané v Cook, P.D., a kol. (Mezinárodní publikační č. WO 92/20822) a ty, které jsou popsány v PCT/US 92/04294.

- 5 Pokud není uvedeno jinak, substituční spojky, jako je formacetalová spojka, $-O-CH_2-O-$, jsou připojeny k jednomu z $4'$, $3'$ či $2'$ uhlíku nukleomonomeru na levé straně a k $5'$ uhlíku nukleomonomeru na pravé straně. Označení uhlíků $4'$, $3'$, $2'$ nebo $5'$ lze změnit v případě, že je k sousedním nukleomonomerům připojena jiná struktura než ribosa, deoxyribosa nebo arabinosa. Těmito strukturami jsou xylosa, hexosa, morfolinový kruh, uhlíkatý cyklus (např. cyklopentan) a podobně.

- Použití karbamátových, karbonátových, sulfidových, sulfoxidových, sulfonových, N-methylhydroxylaminových a dimethylhydrazinových spojek v synthonech nebo oligomerech již bylo popsáno (Vaseur, J.-J., a kol., *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 4006-4007; WO 89/12060; Musicki, B., a kol., *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 4231-4233; Reynolds, R.C., a kol., *J. Org. Chem.*, 1992, 57, 2983-2985; Mertes, M.P., a kol., *J. Med. Chem.*, 1969, 12, 154-157; Mungall, W.S., a kol., *J. Org. Chem.*, 1977, 42, 703-706; Stirchak, E.P., a kol., *J. Org. Chem.*, 1987, 52, 4202-4206; Wang, H., a kol., *Tetrahedron Letts.*, 1991, 32, 7385-7388; Mezinárodní publikační č. PCT US 91/03680). Substituční spojky lze využít v oligomerech za různým účelem jako je další zlepšení vazby s komplementárními cílovými sekvencemi nukleové kyseliny a/nebo pro zvýšení stability oligomerů vůči nukleasám.

Báze:

- Vhodné báze pro použití jako nukleosidové báze ve sloučeninách podle předkládaného technického řešení nezahrnují pouze přirozeně se vyskytující purinové a pyrimidinové báze, ale také analogy těchto heterocyklickýchází a jejich tautomerů. Tyto analogy zahrnují alkylované puriny nebo pyrimidiny, acylované puriny nebo pyrimidiny nebo jiné heterocykly. Takové "analogické puriny" a "analogické pyrimidiny" nebo purinové a pyrimidinové analogy jsou v dané problematice obecně známy, některé z nich se používají jako chemoterapeutická činidla. Příklady, ale ne vyčerpávající, zahrnují N^4,N^4 -ethancytosin, 7-deazaxanthosin, 7-deazaguanosin, 8-oxo- N^6 -methyladenin, 4-acetylcytosin, 5-(karboxyhydroxymethyl)uracil, 5-fluor-uracil, 5-bromuracil, 5-karboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-karboxymethylaminomethyl-uracil, inosin, N^6 -isopentenyladenin, 1-methyladenin, 2-methylguanin, 5-methylcytosin, N^6 -methyladenin, 7-methylguanin, 5-methylaminomethyl-uracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-(1-propinyl)-4-thiouracil, 5-(1-propinyl)-2-thiouracil, 5-(1-propinyl)-2-thiocytosin, 2-thiocytosin a 2,6-diaminopurin. Navíc k těmto analogůmází, zahrnují pyrimidinové analogy 6-azacytosin, 6-azathymidin a 5-trifluormethyluracil, která jsou popsána v Cook, D.P., a kol., Mezinárodní publikační č. WO 92/02258 (uvedeno zde jako reference) lze běžně zavést do oligomerů podle předkládaného technického řešení.

- Zavedení 4-thiouridinu a 2-thiothymidinu do oligomerů bylo popsáno (Nikiforov, T.T., a kol., *Tetrahedron Letts.*, 1992, 33, 2379-2382; Clivio, P., a kol., *Tetrahedron Letts.*, 1992, 33, 65-68; Nikiforov, T.T., a kol., *Tetrahedron Letts.*, 1991, 32, 2505-2508; Xu, Y.-Z., a kol., *Tetrahedron Letts.*, 1991, 32, 2817-2820; Clivio, P., a kol., *Tetrahedron Letts.*, 1992, 33, 69-72; Connolly, B.A., a kol., *Nucl. Acids Res.*, 1989, 17, 4957-4974). Preferované báze zahrnují adenin, guanin, thymin, uracil, cytosin, 5-methylcytosin, 5-(1-propinyl)uracil, 5-(1-propinyl)cytosin, 8-oxo- N^6 -methyladenin, 7-deaza-7-methylguanin, 7-deaza-7-methyladenin a 7-deazaxanthosin.

- 45 **Skupina schopná kovalentní vazby:**

- V některých oligomerech podle předkládaného technického řešení jsou zavedeny skupiny, které dokáží vytvořit alespoň jednu kovalentní vazbu mezi oligomerem a dvojšroubovicí. Zavedením zesíťujících skupin mohou také vzniknout několikanásobné kovalentní vazby. Preferována je kovalentní vazba sází cílového vlákna, ale může být vytvořena i s jinými částmi cíle, včetně sacharidu nebo fosfodiesteru. Reakční povaha skupiny, která vytváří zesíťování, určuje povahu cíle v dvojšroubovicí. Preferovaná zesíťující činidla zahrnují acylační a alkylační činidla a

zejména ta, která jsou umístěna relativně k sekvenční specifitu zajišťující části tak, že umožňují reakci s cílovým místem vlákna.

Je jasné, že heterocyklus nemusí být purin nebo pyrimidin; ve skutečnosti pseudo-báze, ke které je připojena reaktivní skupina, vůbec nemusí být heterocyklus. Uspokojující je jakýkoliv způsob
5 připojení reaktivní skupiny, při kterém je její umístění správné.

Polarita oligomerů:

V nejobecnější formě indikuje symbol 3'----5' prodloužení oligomeru, ve kterém jsou spojky tvořeny mezi 5' hydroxylem aminokyselinového zbytku nukleomonomeru nalevo s 3' (nebo 2' pro oligomery, které mají spojení 2'-5' nebo 4' pro oligomery, které mají spojení 4'-5') hydroxylem
10 aminokyselinového zbytku nukleomonomeru napravo (tj. oblast uniformní polarity), takto zůstává 5'-hydroxyl nejpravějšího nukleomonomerního aminokyselinového zbytku volný pro další konjugaci. Analogicky, 5'----3' označuje prodloužení oligomeru opačné orientace, ve kterém jsou spojky tvořeny mezi 3'-hydroxylem aminokyselinového zbytku levého nukleomonomeru a 5'-hydroxylem aminokyselinového zbytku nukleomonomeru napravo, takto zůstává 3'-hydroxyl
15 nejpravějšího nukleomonomerního zbytku volný pro další konjugaci. Totéž platí pro označení 5'----4' oligomerů.

Farmaceuticky přijatelné soli:

Technické řešení také poskytuje různé soli všech sloučenin popsanych v tomto dokumentu, včetně farmaceuticky přijatelných solí pro podávání živočichům nebo lidem. Farmaceuticky
20 přijatelné soli a materiály, které tvoří tyto soli, jsou v dané problematice dobře známy. Farmaceuticky přijatelné soli jsou s výhodou kovové nebo amonné soli oligomerů podle předkládaného technického řešení a zahrnují soli alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin, např. sodné, draselné, hořečnaté nebo vápenaté soli; nebo, s výhodou, snadno krystalizující amonné soli odvozené od amoniaku nebo organických aminů, jako jsou mono-, di- nebo tri- nižší
25 (alkyl, cykloalkyl nebo hydroxyalkyl)amidy, nižší alkylendiaminy nebo nižší (hydroxyalkyl nebo arylalkyl)alkylamoniové báze, např. methylamin, diethylamin, triethylamin, dicyklohexylamin, triethanolamin, ethylendiamin, tris-(hydroxymethyl)aminomethan nebo benzyltrimethylamoniumhydroxid. Oligomery podle předkládaného technického řešení tvoří soli vzniklé přidáním kyseliny, s výhodou s terapeuticky přijatelnými anorganickými nebo organickými kyselinami,
30 jako jsou silné minerální kyseliny, například hydrofilní, např. kyselina chlorovodíková nebo bromovodíková; sírová nebo fosforečná; alifatické nebo aromatické karbocyklické nebo sulfonové kyseliny, např. mravenčí, octová, propionová, jantarová, glykolová, mléčná, jablečná, vinná, glukonová, citronová, askorbová, maleinová, fumarová, hydroxymaleinová, pyrohroznová, fenyloctová, benzoová, 4-aminobenzoová, anthranilová, 4-hydroxybenzoová, salicylová, 4-
35 amino-salicylová, methansulfonová, ethansulfonová, hydroxyethan-sulfonová, benzensulfonová, sulfanilová nebo cyklohexyl-sulfamová kyselina a podobně.

Použití a podávání:

Protože jsou oligomery podle předkládaného technického řešení schopné znatelné vazebné aktivity k jednovláknové nebo dvojitě vláknové cílové nukleové kyselině tak, že tvoří dvoj-
40 šroubovice nebo trojšroubovice nebo jiné formy stabilní asociace s přirozeně se vyskytujícími polynukleotidy a jejich strukturními analogy, oligomery podle předkládaného technického řešení lze použít ve většině případů kde se používá běžných oligomerů. Oligomery podle předkládaného technického řešení lze použít jako, například, polynukleotidové hybridizační sondy, primery pro polymerasovou řetězovou reakci a podobné cyklické amplifikační reakce, sekvenční primery a
45 podobně. Oligomery podle předkládaného technického řešení lze také použít v diagnóze a léčení nemocí. Terapeutické použití oligomerů podle předkládaného technického řešení zahrnuje specifickou inhibici exprese genů (nebo inhibici translace RNA sekvencí kódovaných těmito geny), které jsou spojeny buď s vyvoláním nebo udržováním patologického stavu, použitím antisense oligomerů. Oligomery podle předkládaného technického řešení lze použít k vyvolání
50 antisense inhibice různých genetických cílů. Příklady genů nebo RNA kódovaných těmito geny,

5 které mohou být cíly oligomerů zahrnují ty, které kódují enzymy, hormony, sérové proteiny, transmembránové proteiny, adhezní molekuly (LFA-1, GPIIb/IIIa, ELAM-1, VACM-1, ICAM-1, E-selekce a podobně), receptorové molekuly včetně cytokinových receptorů, cytokiny (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 a podobně), onkogeny, růstové faktory a interleukiny. Cílové geny nebo RNA mohou být spojeny s patologickým stavem jako jsou ty spojené se záněty, kardiovaskulárními nemocemi, imunitními reakcemi, rakovinou, virovými infekcemi a podobně.

Oligomery podle předkládaného technického řešení jsou vhodné pro použití při léčení jak *in vivo*, tak *ex vivo*. Indikace pro *ex vivo* použití zahrnují léčení buněk jako je kostní dřev nebo periferní krev při stavech jako je leukémie (chronická myelogenní leukémie, akutní lymfotická leukémie) nebo virová infekce. Cílové geny nebo RNA kódované těmito geny, které slouží jako cíle pro 10 léčení rakoviny zahrnují onkogeny, jako je ras, k-ras, bcl-2, c-myb, bcr, c-myc, c-abl nebo přeexpresované sekvence jako je mdm2, onkostatín M, IL-6 (Kaposiho sarkom), HER-2 a translokace jako je bcr-abl. Virové genové sekvence nebo RNA kódované těmito geny jako jsou polymerasové nebo reversně transkriptasové geny herpes virů jako je CMV, HSV-1, HSV-2, 15 retroviry jako je HTLV-1, HIV-1, HIV-2 nebo jiné DNA nebo RNA viry jako je HBV, HPV, VZV, chřipkový virus, adenoviry, flaviviry, rhinoviry a podobně jsou také vhodné cíle. Specificky se vážící oligomery lze použít spolu s jiným způsobem léčení. Jiné terapeutické využití oligomerů podle předkládaného technického řešení zahrnuje (1) úpravu zánětů modulováním exprese genů jako je IL-1 receptor, IL-1, ICAM-1 nebo E-selekce, které hrají roli 20 při zprostředkování zánětu a (2) úprava proliferace buněk za stavu jako je arteriální okluze (restenóza) po angioplastii tak, že upraví expresi (a) růstu mitogenních faktorů jako je nesvalový myosin, myc, fox, PCNA, PDGF nebo FGF nebo jejich receptorů nebo (b) faktory proliferace buněk jako je c-myb. Jiné vhodné proliferční faktory nebo signální faktory transdukce jako je TGF α , IL-6, gINF, proteinová kinasa C, tyrosinové kinasy (jako je p210, p190) mohou být cíly 25 pro léčení psoriázy nebo jiných stavů. Navíc lze EGF receptor, TGF α nebo MHC alely použít jako cíle u autoimunitních onemocnění.

Dopravu oligomerů podle předkládaného technického řešení do buněk lze zlepšit jakoukoliv vhodnou metodou včetně transfekce fosforečnanem vápenatým, DMSO, glycerolem nebo dextranem, elektroporací nebo použitím kationických, anionických a/nebo neutrálních lipidních 30 prostředků nebo liposomů již popsanými způsoby (Mezinárodní publikační č. WO 90/14074, WO 91/16024, WO 91/17424, U.S. Patent 4,897,355). Oligomery lze dopravit do buněk komplexací s kationickými lipidy jako je DOTMA (který může a nemusí být ve formě liposomu) a uvedením tohoto komplexu do kontaktu s buňkami. Vhodné kationické lipidy zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny, N-(2,3-di(9-(Z)-oktadecenyl)-prop-1-yl)-N,N,N-trimethylamoni- 35 um (DOTMA) a jeho soli, 1-O-oleyl-2-O-oleyl-3-dimethylaminopropyl- β -hydroxyethylamonium a jeho soli a 2, 2-bis(oleyloxy)-3-(trimethylamonio)propan a jeho soli.

Zlepšit dopravu oligomerů podle předkládaného technického řešení lze také pomocí použití (i) virů jako je Sendai virus (Bartzatt, R., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1989, 11, 133-135) nebo adenovirus (Wagner, E., a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 6099-6013); (ii) 40 polyaminových nebo polykationtových konjugátů pomocí sloučenin jako je polylysin, protamin nebo Na, N₁₂-bis(etyl)spermin (Wagner, E., a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 4255-4259; Zenke, M., a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 3655-3659; Chank, B.K., a kol., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, 157, 264-270; US Patent 5,138,045); (iii) lipopolyaminových komplexů pomocí sloučenin jako je lipospermin (Behr, J.-P., a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6982-6986; Loeffler, J.P., a kol., *J. Neurochem.*, 1990, 54, 1812-1815); (iv) anionických, neutrálních nebo pH citlivých lipidů pomocí sloučenin zahrnujících 45 anionické fosfolipidy jako je fosfatidylglycerol, kardiolipin, fosfatidová kyselina nebo fosfatidylethanolamin (Lee, K.-D., a kol., *Biochem. Biophys. ACTA*, 1992, 1103, 185-197; Cheddar, G., a kol., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, 294, 188-192; Yoshimura, T., a kol., *Biochem Int.*, 1990, 20, 697-706); (v) konjugátů se sloučeninami jako je transferrin nebo biotin nebo (vi) konjugátů s proteiny (včetně albuminu nebo protilátek), glykoproteinů nebo polymerů 50 (včetně polyethylenglykolu) tak, že jsou v daném případě zlepšeny farmakokinetické vlastnosti oligomerů. Tak jak se používá v předkládaném technickém řešení, transfekce označuje jakýkoliv

způsob, který je vhodný pro dopravu oligomerů do buněk. Jakékoliv činidlo jako je lipid nebo jakékoliv činidlo jako je virus, které lze použít pro transfekci, se souhrnně označuje jako "činidlo zlepšující pronikání". Dopravu oligomerů do buněk lze provést kotransfekcí s jinými nukleovými kyselinami jako jsou (i) exprimovatelné DNA fragmenty kódující protein(y) nebo proteinový fragment nebo (ii) přepisovatelné RNA, které kódují protein(y) nebo proteinový fragment.

Oligomery podle předkládaného technického řešení lze takto zabudovat do jakéhokoliv vhodného prostředku, který zlepšuje dopravu oligomerů do buněk. Vhodné farmaceutické prostředky také zahrnují ty, které se používají v aplikacích, kde jsou sloučeniny dopravovány do buněk nebo tkání povrchové podáváním. Sloučeniny jako je polyethylenglykol, propylenglykol, azon, nonoxonyl-9, kyselina olejová, DMSO, polyaminy nebo lipopolyaminy lze použít pro povrchové prostředky, které obsahují oligomery.

Oligomery podle předkládaného technického řešení lze běžně použít jako činidla pro výzkum nebo účely produkce v případech kdy je žádoucí potlačit genovou expresi. V současnosti je dostupných pouze několik činidel, která jsou účinná a specificky inhibují expresi cílového genu jakýmkoliv mechanismem. Oligomery, o kterých již bylo popsáno, že inhibují expresi cílového genu, mají často nespecifický účinek a/nebo snižují expresi cílového genu na velmi nízkou úroveň (méně než 40 % úrovně v neinhibovaném stavu).

Tak tvoří oligomery popsané v předkládaném technickém řešení činidlo, které lze použít ve způsobech inhibice exprese vybraného proteinu nebo proteinů u subjektu nebo v buňkách, ve kterých jsou proteiny kódovány DNA sekvencemi a proteiny jsou přepisovány z RNA sekvencí, což zahrnuje kroky: dopravení oligomerů podle předkládaného technického řešení do buněk; umožnění oligomerům vytvořit trojšroubovici s DNA nebo RNA nebo dvojšroubovici s DNA nebo RNA díky čemuž je inhibována exprese proteinu nebo proteinů. Způsoby a sloučeniny podle předkládaného technického řešení jsou vhodné pro úpravu exprese genu jak u prokaryotických tak u eukaryotických buněk jako jsou bakteriální, houbových parazitů, kvasinkové a savčí buňky.

RNasa H "kompetentní" nebo RNasa H "nekompetentní" oligomery lze snadno označit pomocí substitučních spojek podle předkládaného technického řešení. RNasa H kompetentní oligomery mohou obsahovat jednu nebo více RNasa H kompetentních domén sestávajících ze spojených RNasa H kompetentních nukleomonomerů. Oligomery, které mají modifikaci jako je 2'-substituce (2'-O-allyl a podobně) nebo určité nenabitě spojky (methylfosfonát, fosforoamidit a podobně) jsou obvykle nekompetentní jako substrát, který je rozeznáván a/nebo zpracováván RNasou H. RNasa H kompetence může usnadnit antisense funkci oligomeru odbouráním cílové RNA v dvojšroubovici RNA-oligomer (Dagle, J.M., a kol., *Nucl. Acids Res.*, 1990, **18**, 4751-4757; Walder, J.A., a kol. Mezinárodní publikační č. WO 89/05358). Enzym štěpí RNA v dvojšroubovicích RNA-DNA.

Aby se udržela RNasa H kompetence, oligomer vyžaduje RNasa H kompetentní doménu ze tří nebo více kompetentních nukleomonomerů, které jsou v ní obsaženy (Quartin, R.S., a kol., *Nucl. Acids Res.*, 1989, **17**, 7253-7262). Návrh oligomerů odolných proti zpracování nukleasami zahrnuje koncovou spojku, modifikaci cukru a/nebo báze, čímž se vyvolá odolnost proti nukleaze. Tak lze navrhnout oligomery, které sestávají z modifikovaných nukleomonomerních zbytků na jednom nebo na obou 5'- a/nebo 3'- koncích, přičemž mají vnitřní RNasa H kompetentní doménu. Příklady oligomerů, které mají RNasa H kompetenci by měly obecně mít jednotnou polaritu a měly by obsahovat 2 až 12 nukleomonomerů na 5'- konci a na 3'- konci, které stabilizují oligomer proti degradaci nukleasami a 3 až 26 nukleomonomerů, které fungují jako RNasa H kompetentní doména mezi RNasa H nekompetentními 3'- a 5' konci. Varianty takového oligomeru by měly zahrnovat (1) kratší RNasa H kompetentní doménu, která obsahuje 1 nebo 2 RNasa H kompetentní spojky nebo substituční spojky, (2) delší RNasa H nekompetentní doménu, která obsahuje až 15, 20 nebo více substitučních spojek nebo nukleomonomerů, (3) delší RNasa H kompetentní doménu, která obsahuje až 30, 40 nebo více spojek, (4) oligomery s pouze jednou RNasa H nekompetentní doménou na 3' konci nebo 5' konci.

Oligomery, které obsahují 8 nukleomonomerů lze použít pro inhibici exprese cílového proteinu(ů) tak, že vytvoří dvojšroubovicové nebo trojšroubovicové struktury s cílovými sekvencemi nukleové kyseliny. Nicméně lineární oligomery použité pro inhibici exprese cílového proteinu tím, že vytvoří dvojšroubovici nebo trojšroubovici, mají s výhodou 10 až 20 nukleomonomerních zbytků.

Oligomery, které obsahují substituční spojky podle předkládaného technického řešení lze běžně cirkularizovat popsáním způsobem (Mezinárodní publikační č. WO92/19732; Kool., E.T., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 6265-6266; Prakash, G., a kol., *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 3523-3527). Takové oligomery jsou vhodné pro vazbu k jednovláknovým nebo dvojitým nukleokyselinovým cílům. Cirkulární oligomery mohou mít různé velikosti. Takové oligomery ve velikostním rozsahu 22 až 50 nukleomonomerů lze běžně připravit. Cirkulární oligomery mohou mít tři až šest nukleomonomerních zbytků v oblasti smyčky, která odděluje vazebné domény oligomeru jak již bylo popsáno (Prakash, G., a kol., *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 3523-3527). Oligomery lze enzymaticky cirkularizovat přes koncový fosfát pomocí ligasy nebo chemickými prostředky přes spojku mezi 5'- a 3'- koncovými cukry a/nebo bázemi.

Oligomery lze použít pro úpravu exprese cílového genu inhibicí interakce vazebných proteinů nukleové kyseliny zodpovědných za modulaci transkripce (Maher, L.J., a kol., *Science*, 1989, 245, 725-730) nebo translace. Oligomery jsou tak vhodné jako sekvencně specifická činidla, která soutěží s vazebnými proteiny nukleové kyseliny (včetně ribosomů, RNA polymeras, DNA polymeras, iniciačních faktorů translace, faktorů transkripce, které buď zvýší nebo sníží transkripci, faktory transkripce proteinových hormonů a podobně). Vhodně navržené oligomery tak lze použít pro zvýšení syntézy cílového proteinu tak, že dojde k vazbě do, nebo v blízkosti, regulačního místa, které transkripční faktory používají pro utlumení exprese nebo pro inhibici exprese vybraného represorového proteinu.

Oligomery podle předkládaného technického řešení, obsahující další modifikace, které zvýší vazebnou afinitu, lze navrhnout tak, že obsahují sekundární nebo terciární struktury, jako jsou pseudouzly nebo pseudo-polo-uzly (Ecker, D.J., a kol., *Science*, 1992, 257, 958-961). Takové struktury mohou mít stabilnější sekundární nebo terciární strukturu než příslušné nemodifikované oligomery. Zlepšená stabilita takových struktur bude záviset na zvýšené vazebné afinitě mezi oblastmi samokomplementarity v jediném oligomeru nebo oblastmi komplementarity mezi dvěma nebo více oligomery, které tvoří danou strukturu. Takové struktury lze použít pro mimikování struktur jako je HIV TAR struktura, aby došlo k interferenci s vazbou HIV Tat proteinu (protein, který se váže k TAR). Podobného výsledku lze dosáhnout s jinými faktory transkripce nebo translace, které rozeznávají vyšší nukleokyselinové struktury jako jsou stonky, smyčky, vlásenky, uzly a podobně. Alternativně lze oligomery podle předkládaného technického řešení použít pro (1) narušení nebo (2) vazbu k takovým strukturám jako způsob (1) interference s nebo (2) zlepšení vazby proteinů k nukleokyselinovým strukturám.

Navíc k jejich použití pro antisense nebo trojšroubovicovou terapii, oligomery podle předkládaného technického řešení lze také použít jako terapeutická nebo diagnostická činidla, která fungují přímým nahrazením jednoho vlákna v dvojšroubovicové nukleové kyselině. Nahrazení vlákna v přirozené dvojšroubovici jako je chromosomální DNA nebo dvojšroubovice virové DNA, RNA nebo hybridní DNA/RNA je možné u oligomerů s vysokou vazebnou afinitou ke své komplementární sekvenci. Terapeutická účinnost oligomerů, které fungují pomocí D-smyčky, je důsledkem vysoké afinity vazby ke komplementární sekvenci, což vede k úpravě normální biologické funkce spojené s cílovou nukleovou kyselinou. Typy cílových nukleových kyselin zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny, (i) genové sekvence včetně exonů, intronů, spojení exon/intron, oblastí promotor/enhancer a 5' nebo 3' nepřepisované oblasti, (ii) oblasti nukleových kyselin, které využívají sekundární struktury pro svou funkci (např. prvek HIV-TAR stonek-smyčka nebo tRNA), (iii) nukleové kyseliny, které slouží svou strukturou nebo jinou funkcí jako telomery, centromery nebo replikační oblasti (virus, bakterie a podobně) a (iv) jakákoliv dvojšroubovicová oblast. Je jasné, že oligomery lze syntetizovat s diskrétními funkčními doménami, ve kterých se jeden region oligomeru váže k cíli pomocí D-smyčky, zatímco sousední oblast se váže k cílové molekule tvorbou trojšroubovice nebo vazby jako

aptamer k proteinu. Alternativně se D-smyčkový oligomer může vázat ke každému vláknu ve dvojšroubovici sepnutím vláken, ke kterým se oligomer váže (tj. jedna oblast oligomeru se váže k jednomu vláknu a jiná oblast se váže ke komplementárnímu vláknu). Kontrolní prvky, které určují způsob vazby (tj. trojšroubovice nebo D-smyčka) jsou sekvence oligomeru a inherentní afinita vestavěná do oligomeru. Párování bází ve Watsonově-Crickově dvojšroubovici se liší o párování v Hoogsteenově trojšroubovici. Z tohoto důvodu lze sekvenci bází v oligomeru použít pro vynucení typu vazebních pravidel párování pro, které bude oligomer použit. D-smyčkovité struktury jsou v přírodě tvořeny pomocí enzymů (Harris, L.D., a kol., *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 9285-9292) nebo jsou spojeny s oblastmi, kde dochází k replikaci DNA (Jacobs, H.T., a kol., *Nucl. Acids. Res.*, 1989, 17, 8949-8966). D-smyčky, které vznikají vazbou oligomerů mohou být výsledkem jednostupňového nebo dvoustupňového procesu. Přímé nahrazení cílového vlákna vede k D-smyčce přes jediný vazebný děj. Ale D-smyčka může také vzniknout tak, že se vytvoří trojšroubovice, která usnadní nahrazení vlákna, které vede k D-smyčce.

Ribozymy, které obsahují substituční spojky podle předkládaného technického řešení, lze navrhnout tak, aby vznikly látky s pozměněnými vlastnostmi. Byly popsány ribozymy, které štěpí jednovláknovou RNA nebo DNA (Robertson, D.L., a kol., *Nature*, 1990, 344, 467-468). Terapeutická použití ribozymů již byla popsána (Sarver, N., a kol., *Science*, 1990, 247, 1222-1225; Mezinárodní publikační č. WO 91/04319). Sekundární nebo terciární strukturu potřebnou pro funkci ribozymu lze ovlivnit návrhem vhodných sekvencí oligomeru. Například ribozymy, které mají domény stabilní proti nukleasám, a obsahují substituční spojky podle předkládaného technického řešení mají, při zachování specifity párování bází, vyšší afinitu pro cílové sekvence. Z důvodů vyšší afinity a/nebo stability vůči nukleasám substitučních spojek podle předkládaného technického řešení může být navržena kratší rozpoznávací doména v ribozymu (výhoda při výrobě), což vede k lepší přeměně substrátu (výhoda funkce ribozymu). V terapeutických aplikacích lze oligomery podle předkládaného technického řešení využít způsoby vhodnými pro léčení různých stavů inhibicí exprese vhodných cílových genů. Pro takovou terapii mohou být oligomery podávány různými způsoby včetně systemického, povrchového nebo lokálního podávání. Techniky a prostředky lze obecně nalézt v posledním vydání knihy Remington's Pharmaceutical Sciences, Merck Publishing Co., Easton, PA. Oligomerní aktivní složka je obecně kombinována s nosičem jako je ředidlo nebo excipient, což může zahrnovat plnidla, nastavovačla, pojiva, zvlhčovačla, desintegrátory, povrchově aktivní činidla nebo mazadla, v závislosti na způsobu podávání a dávkovacích formách. Typické dávkovací formy zahrnují tablety, prášky, kapalně prostředky včetně suspenzí, emulzí a roztoků, granule, kapsle a doplňky výživy stejně jako kapalně prostředky pro injikování, včetně liposomových preparátů.

Pro systemické podávání, jsou preferovány injekce včetně intramuskulárních, intravenózních, intraperitoneálních a subkutánních. Pro injekce jsou oligomery podle předkládaného technického řešení v kapalných roztocích, s výhodou ve fyziologicky slučitelných pufrch jako je Hankův roztok nebo Ringerův roztok. Navíc oligomery mohou být v pevné formě a opět rozpuštěny nebo suspendovány těsně před použitím. Lyofilizované formy jsou také zahrnuty. Dávkování, které se používá pro systemické podávání se s výhodou mění v rozsahu 0,1 mg/kg až 50 mg/kg podáváno jednou nebo dvakrát denně. Ale lze použít i jiná schémata podávání v závislosti na (i) účinnosti jednotlivého oligomeru při inhibici aktivity jeho cílové DNA nebo RNA, (ii) prudkosti nebo rozsahu patologického stavu nemoci spojeného s daným cílovým genem nebo (iii) farmakokinetického chování daného oligomeru.

Systemické podávání může být také transmukosální nebo transdermální nebo mohou být sloučeniny podávány orálně. Pro transmukosální nebo transdermální podávání jsou v prostředku používány látky pro přestup bariéry. Takové látky jsou v dané problematice obecně známy a zahrnují, například, žlučové soli a deriváty kyseliny fusidové pro transmukosální podávání. Navíc lze pro usnadnění přestupu použít detergenty. Transmukosální podávání lze provést pomocí, například, nosních spejů nebo doplňků výživy. Pro orální podávání jsou oligomery ve formě běžných orálních forem podávány jako jsou kapsle, tablety a kapaliny.

Pro orální podávání jsou oligomery podle předkládaného technického řešení ve formě mastí, gelů nebo krémů jak je v dané problematice známo. Prostředky oligomerů podle předkládaného

technického řešení pro oční použití jako jsou virové infekce jsou založeny na standardních prostředcích známých v dané problematice.

Navíc k použití v terapii, lze oligomery podle předkládaného technického řešení použít jako diagnostická činidla pro zjištění přítomnosti nebo nepřítomnosti cílových sekvencí nukleové kyseliny, ke kterým se specificky váží. Zlepšená vazebná afinita oligomerů podle předkládaného technického řešení je výhodou pro jejich použití jako primerů a sond. Diagnostické testy lze provést hybridizací přes tvorbu dvoj nebo trojšroubovic, které jsou pak detekovány běžnými prostředky. Například lze oligomery označit pomocí radioaktivních, fluorescenčních nebo chromogenních značek a detekovat přítomnost značek vázaných k pevné fázi. Alternativně lze přítomnost dvoj nebo trojšroubovic detekovat pomocí protilátek, které specificky rozeznávají tyto formy. Prostředky pro provedení testů za použití takových oligomerů jako sond jsou v dané problematice obecně známy.

Použití oligomerů podle předkládaného technického řešení se substitučními spojkami jako diagnostických činidel tvorbou trojšroubovic je výhodné, protože trojšroubovice se tvoří za mírných podmínek a testy tak lze provést aniž by byl testovaný subjekt podroben příliš drsným podmínkám. Diagnostické testy založené na detekci RNA pro identifikaci bakterií, hub nebo protozoálních sekvencí často vyžadují izolaci RNA ze vzorku nebo organismu pěstovaného v laboratoři, což je pracné a časově náročné, protože RNA je výrazně citlivá na všudypřítomné nukleasy.

Do oligomerních sond lze také zahrnout další modifikace jako jsou modifikované cukry a/nebo substituční spojky, které činí oligomer obzvláště stabilní vůči nukleasám a tak ho činí použitelným pro testy prováděné v přítomnosti buněk nebo tkáňových extraktů, které normálně mají nukleasovou aktivitu. Oligomery, které obsahují koncové modifikace, si často drží svou kapacitu vázat se ke komplementárním sekvencím bez ztráty specifity (Uhlmann, a kol., *Chemical Reviews*, 1990, 90, 543-584). Jak bylo uvedeno výše, sondy podle předkládaného technického řešení také mohou obsahovat spojky, které umožňují specifickou vazbu k alternujícím vláknům DNA pomocí zahrnutí spojek, které umožňují takovou vazbu (Froehler, B.C., a kol., *Biochemistry*, 1992, 31, 1603-1609; Horne, a kol., *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 2435-2437).

Zahrnutí analog bází podle předkládaného technického řešení do sond, které také obsahují kovalentní zesilující činidla, vede k zvýšení citlivosti a snížení pozadí při diagnostických nebo detekčních testech. Navíc, použití zesilujících činidel dovolí nové modifikace testů jako je (1) použití zesílení pro zvýšení selektivity sondy, (2) zahrnutí kroku denaturačního promývání pro snížení pozadí a (3) provedení hybridizace a zesílení při, nebo blízko, teplotě tání hybridu pro snížení sekundární struktury cíle a pro zvýšení specifity sondy. Modifikace podmínek hybridizace již byly popsány (Gamper, a kol., *Nucleic Acids Res.*, 1986, 14, 9943).

Oligomery podle předkládaného technického řešení jsou vhodné pro použití v diagnostických testech, které využívají metod, ve kterých je buď detekovaný oligomer nebo nukleová kyselina, kovalentně připojena k pevné fázi jak již bylo popsáno (U.S. Patent č. 4,775,619). Oligomery jsou také vhodné pro použití v diagnostických testech, které závisí na polymerasové řetězové reakční technice pro zmnožení cílových sekvencí popsánymi způsoby (Evropská patentová publikace č. 0,393,744). Oligomery podle předkládaného technického řešení obsahující 3' konec, který slouží jako primer, jsou kompatibilní s polymerasami používanými v polymerasových řetězových reakčních technikách jako je Taq nebo Vent™ (New England Biolabs) polymerasa. Oligomery podle předkládaného technického řešení lze tak použít jako primery v PCR postupech.

Oligomery podle předkládaného technického řešení jsou použitelné jako primery, které mají přesnou nebo náhodnou sekvenci. Primery s náhodnou sekvencí mohou být obecně dlouhé 6, 7 nebo 8 nukleomonomerů. Tyto primery lze použít v různých postupech zmnožování nukleové kyseliny (PCR, ligasová řetězová reakce, atd.) nebo v postupech klonování. Substituční spojky podle předkládaného technického řešení obecně neinterferují se schopností oligomeru fungovat jako primer. Oligomery podle předkládaného technického řešení, které mají 2'- modifikace na jiných místech než je 3'- koncový zbytek, jiné modifikace, které dosáhnou toho, že je oligomer

RNasa H nekompetentní nebo jinak stabilní vůči nukleasám, lze s výhodou využít jako sondy nebo primery pro RNA nebo DNA sekvence v buněčných extraktech nebo jiných roztocích, které obsahují nukleasy. Tak lze oligomery použít v postupech pro zmnožování nukleové kyseliny ve vzorku tak, že se smíchá oligomer se vzorkem, který obsahuje cílovou nukleovou kyselinu, následuje hybridizace oligomeru s cílovou nukleovou kyselinou a zmnožení cílové nukleové kyseliny pomocí PCR, LCR nebo jiných postupů.

Oligomery derivatizované chelatačními činidly jako je EDTA, DTPA nebo analogy 1,2-diaminocyklohexanocové kyseliny lze využít v různých *in vitro* diagnostických testech jak již bylo popsáno (U.S. Patenty č. 4,772,548, 4,707,440 a 4,707,352). Alternativně lze oligomery podle předkládaného technického řešení derivatizovat zesilujícími činidly jako je 5-(3-jodacetamidoprop-1-yl)-2'-deoxyuridin nebo 5-(3-(4-brom-butyramido)prop-1-yl)-2'-deoxyuridin a použít v různých způsobech testů nebo sadách podle popisu (Mezinárodní publikační č. WO 90/14353).

Kromě výše uvedených použití lze schopnost oligomerů inhibovat genovou expresi ověřit v *in vitro* systémech tak, že se měří úroveň exprese v testovaných buňkách nebo v rekombinantních systémech vhodnými metodami (Graessmann, M., a kol., *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 53-59).

Následující příklady nabízejí lepší osvětlení popsaného technického řešení. Příklady jsou uvedeny pro ilustraci technického řešení a neměly by být vykládány jako omezení technického řešení.

20 Příklady provedení technického řešení

Přehled syntézy nukleomonomerního syntonu a oligomerů:

Oligomery podle předkládaného technického řešení lze syntetizovat reakcemi, které jsou v dané problematice syntézy oligonukleotidových derivátů známé. Viz, např., Flandor, J., a Yam, S.Y., *Tetrahedron Letts.*, 1990, 31, 597-600; Mattson, R.J., a kol., *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 2552-2554; Chung, C.K., a kol., *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 2767-2769.

Jak lze vidět z různorodosti povahy substitučních spojek uvedených konkrétně v tabulce 1, substituční spojky podle předkládaného technického řešení se mohou lišit tak, že obsahují jeden nebo více atomů dusíku, síry a/nebo kyslíku ve své struktuře. Umístění těchto atomů v substituční spojkce se může měnit od "5' " konce přes "prostředek" k "2' " nebo "3' " a "4' " konec. V této části je uvedena série reprezentativních syntetických reakčních obrázků, které poskytují cestu k různým umístěním a kombinacím atomů dusíku a kyslíku v substitučních spojkách.

Syntézy ilustrované na obrázcích 1 až 25 lze modifikovat, jak je známo každému odborníkovi v oblasti oligonukleotidové chemie. Například, ačkoliv chránění bází není vždy uvedeno v syntetických obrázcích, může být toto chránění žádoucí a lze jej provést pomocí činidel a postupů, které jsou v dané oblasti známy. Viz, např. *Protective Groups in Organic Chemistry* (Theodora W. Grene, John Wiley and Sons, 1981). Podobně, ačkoliv je v některých případech použití chránicích skupin vyznačeno, není vždy nezbytně nutné blokovat reaktanty, aby proběhla syntéza oligomerů podle předkládaného technického řešení.

Příklad 1

Prvních pět kroků vyobrazených na obrázku 1 se týká přípravy isobutyrylem chráněného serinolového aminokyselinového alkoholu. Šestý a následující kroky v obrázku 1 se týkají syntézy serinolem substituovaného thyminového fosforamiditového stavebního bloku.

V kroku 1 obrázku 1 se aminoskupina aminokyseliny serinu chránila reakcí sloučeniny obecného vzorce (CXXXII) s di-tert.-butyldikarbonátem, čímž byla získána sloučenina obecného vzorce (CXXXIII). Lze použít i jiné ekvivalentní chránicí skupiny. V dalším kroku byla β-hydroxyskupina sloučeniny obecného vzorce (CXXXIII) blokována dihydropyranem, čímž byla získána plně chráněná aminokyselina obecného vzorce (CXXXIV). Aminokyselina obecného vzorce

(CXXXIV) pak byla nechána reagovat s komplexem diboranu s dimethylsulfidem, čímž byl získán alkohol obecného vzorce (CXXXV), který po reakci s isobutyrylchloridem poskytl sloučeninu obecného vzorce (CXXXVI). Tuto redukční reakci lze také provést pomocí isobutyrylchloroformiátu a tetrahydridoboritanu sodného (viz Ramasamy, K., Olsen, R.K. a Emery, T., *Synthesis*, 1982, 42). Reakcí sloučeniny obecného vzorce (CXXXVI) s kyselinou trifluoroctovou po dobu 30 minut následované promytím s NaHCO₃, byla získána sloučenina obecného vzorce (CXXXVII).

Thymin octová kyselina obecného vzorce (CXXXVIII) byla připravena postupem popsaným v literatuře (viz Kosynkina, L., Wang, W. a Liang, T.C., *Tetrahedron Letts.*, 1994, 35, 5173). Spojením sloučeniny obecného vzorce (CXXXVIII) se sloučeninou obecného vzorce (CXXXVII) za podmínek syntézy přes směsné anhydridy byla získána sloučenina obecného vzorce (CXXXIX). Dimethoxytritylací sloučeniny obecného vzorce (CXXXVIII) pomocí DMTCl byla získána sloučenina obecného vzorce (CXL), která po bazické hydrolýze poskytla sloučeninu obecného vzorce (CXLI). Fosfitylací sloučeniny obecného vzorce (CXLI) za standardních podmínek byl získán serinolem spojený thyminový stavební blok obecného vzorce (CXLII). Tento synthon lze pak připojit k rostoucímu oligomeru pomocí běžných chemických postupů. Pro spojení monomerů nebo dimerů postupem analogickým popsanému lze použít jakoukoliv syntetickou techniku pro DNA jako je fosforamidátová nebo fosfonátová metoda.

Příklad 2

Na reakčním obrázku 2 byl thyminaldehyd obecného vzorce (CXLIV) připraven tak, že se nechal reagovat thymin s bromacetaldehyddimethylacetalem a následovala hydrolýza sloučeniny obecného vzorce (CXLIII) s vodnou TFA. Aldehyd obecného vzorce (CXLIV) a amin obecného vzorce (CXXXVII) pak byly spojeny a příslušný meziprodukt byl převeden na fosforoamiditový stavební blok obecného vzorce (CXLVIII) analogickým způsobem jako v reakčním obrázku 1.

25 Příklad 3

Na reakčním obrázku 3 byla výchozí látkou β-substituovaná aminokyselina obecného vzorce (CXLIX). Substituovanou aminokyselinu lze převést na fosforamiditový stavební blok obecného vzorce (CLVIII) stejným postupem, který byl použit v reakčních obrázcích 1 a 2.

Příklad 4

Na obrázku 4 byl výchozí aminoalkohol obecného vzorce (CLII) oxidován směsí CrO₃/pyridin na aldehyd obecného vzorce (CLIX). Z aldehydu obecného vzorce (CLIX) byla reakcí s alkylhalogenidem v přítomnosti báze získána sloučenina obecného vzorce (CLX). Aminoalkohol obecného vzorce (CLX) lze pak převést na stavební blok obecného vzorce (CLXVI) stejným postupem, který byl použit v reakčních obrázcích 1 a 2.

35 Příklad 5

Na obrázku 5 jsou první čtyři kroky stejné jako v obrázku 1, přičemž výchozí látkou byla místo serinu kyselina asparagová. Methylester kyseliny asparagové obecného vzorce (CLXVII) poskytl plně chráněný alkohol obecného vzorce (CLXXI), který po selektivním odchránění kyselinou octovou poskytl sloučeninu obecného vzorce (CLXXII). Oxidací sloučeniny obecného vzorce (CLXXII) směsí CrO₃/pyridin byl získán příslušný aldehyd obecného vzorce (CLXXIII). Redukční aminací aldehydu obecného vzorce (CLXXIII) pomocí O-benzylhydroxylaminu v přítomnosti triacetoxihydridoboritanu sodného byla získána sloučenina obecného vzorce (CLXXIV) (viz Kolasa, T., Miller, J.M., *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 1711). Alkohol obecného vzorce (CLXXIV) byl pak převeden na aldehyd obecného vzorce (CLXXVII) stejným postupem

jaký byl již popsán výše s tím rozdílem, že pro hydroxyl sloučeniny obecného vzorce (CLXX) byla použita allylová chránicí skupina. Spojením aldehydu obecného vzorce (CLXXVII) a hydroxylaminu obecného vzorce (CLXXIV) v přítomnosti triacetoxyhydridoboritanu sodného a odchráněním chránicí skupiny pro amin byl získán bisamin obecného vzorce (CLXXIX).
 5 Bisamin obecného vzorce (CLXXIX) pak byl převeden na dimer obecného vzorce (LXXXIV) stejným postupem, který byl použit v obrázku 1.

Příklad 6

Na obrázku 6 byla spojením alkoholu obecného vzorce (CLXXXV) s O-benzylhydroxylaminem obecného vzorce (CLXXXVI) za podmínek Mitsunobuovy reakce (viz Mitsunobu, O., *Synthesis*, 1981, 1) připravena sloučenina obecného vzorce (CLXXXVII). Meziprodukt obecného vzorce (CLXXXVII) poskytl po hydrogenaci a acetylaci sloučeninu obecného vzorce (CLXXXVIII).
 10 Působením TFA na sloučeninu obecného vzorce (CLXXXVIII) byla odstraněna chránicí skupina "TBDMSi" a tak získána sloučenina obecného vzorce (CLXXXIX). Spojením sloučeniny obecného vzorce (CLXXXIX) se sloučeninou obecného vzorce (CXXXVIII) a dimethoxytritylací
 15 byla získána sloučenina obecného vzorce (CXCI). Stavební blok obecného vzorce (CXCI) byl ze sloučeniny obecného vzorce (CXCI) získán bazickou hydrolyzou a následnou fosfitylací.

Příklad 7

Na obrázku 7 byl serinol obecného vzorce (CXXXV) převeden na halogenid obecného vzorce (CXC) a alkylován thyminem čímž byla získána sloučenina obecného vzorce (CXCIV). Chránicí skupiny ve sloučenině obecného vzorce (CXCIV) byly odstraněny a spojením s hydroxy-
 20 octovou kyselinou chráněnou DMT následovaným fosfitylací byla získána sloučenina obecného vzorce (CXCVII).

Příklad 8

Na obrázku 8 byl alkohol obecného vzorce (CXCIV) spojen s N-hydroxylaminpropanovou
 25 kyselinou obecného vzorce (CC) čímž byla získána sloučenina obecného vzorce (CCI). Alkylací thyminu halogenidem obecného vzorce (CCIV) byla získána sloučenina obecného vzorce (CCVII), ze které byla po odchránění a spojení se sloučeninou obecného vzorce (CCVII) následovaném hydrolyzou získána sloučenina obecného vzorce (CCIX). Kondenzací sloučeniny obecného vzorce (CCIX) se sloučeninou obecného vzorce (CCI) následovanou fosfitylací byl
 30 získán hydroxamátový dimer obecného vzorce (CCXI).

Příklad 9

Na obrázku 9 byl N-hydroxylaminpropionaldehyd obecného vzorce (CCXII) spojen s alkoholem obecného vzorce (CXCIV). Dimer obecného vzorce (CCXIX) byl připraven ze sloučenin obecného vzorce (CCXIV) a (CCXVII) stejným postupem, který byl použit v obrázku 8.

35 Příklad 10

Na obrázku 10 byla alkylací (viz Kolasa, T., Miller, M.J., *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 4246) methylesteru α -brom- β -aminopropanové kyseliny obecného vzorce (CCXX) pomocí thyminu získána sloučenina obecného vzorce (CCXXI). Meziprodukt obecného vzorce (CCXXI) poskytl po hydrolyze s hydroxidem sodným kyselinu obecného vzorce (CCXXII), která po spojení se
 40 sloučeninou obecného vzorce (CXXXVII) poskytla sloučeninu obecného vzorce (CCXXIII). Sloučenina obecného vzorce (CCXXIII) pak byla převedena na fosforamiditový stavební blok obecného vzorce (CCXXVI) stejným postupem, který byl použit v obrázku 1.

Příklad 11

- Na obrázku 11 byl thymin alkylován alkyaminhalogenidem obecného vzorce (CCXXVII) (viz Olsen, R.K., Ramasamy, K., Emery, T., *J. Org. Chem.*, 1984, 49, 3527 a Islam, a kol., *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 293-304 pro přípravu aminoalkylhalogenidu) čímž byla získána sloučenina obecného vzorce (CCXXVIII). Působením TFA na sloučeninu obecného vzorce (CCXXVIII) a následnou alkylací byla získána sloučenina obecného vzorce (CCXXXI). Stavební blok obecného vzorce (CCXXXIV) byl získán ze sloučeniny obecného vzorce (CCXXXI) dimethoxytritylací, hydrolyzou a fosfitylací.

Příklad 12

- Obrázek 12 je alternativní cestou přípravy dimeru s hydroxamátovým základním řetězcem obecného vzorce (CCXLII) z N-hydroxylaminu obecného vzorce (CLXXIV) a aldehydu obecného vzorce (CCXXXVIII), který byl připraven z kyseliny asparagové.

Příklad 13

- Na obrázku 13 byl dimer obecného vzorce (CCXLXVI) připraven z meziprojektu obecného vzorce (CCXXXIX) a (CXLIV) stejným postupem, který byl použit v obrázku 2.

Příklad 14

- Na obrázku 14 byl připraven N-hydroxylthymin (viz Kim, C.U., a kol., *Tetrahedron Letts.*, 1992, 33, 25-28) a spojen s N-hydroxyftalimidem čímž byla získána sloučenina obecného vzorce (CCXLVIII), která po působení hydrazinu v ethanolu poskytla sloučeninu obecného vzorce (CCXLIX). Reakcí sloučeniny obecného vzorce (CCXLIX) s glycerolepoxidem chráněným DMT byla získána sloučenina obecného vzorce (CCLI). Meziprojekt obecného vzorce (CCLI) pak byl převeden na fosforamidit obecného vzorce (CCLII) standardním postupem. Ve druhé syntéze byla sloučenina obecného vzorce (CCXLIX) spojena s aldehydem odvozeným od aminokyseliny (CCLIII) za podmínek reduktivní aminace čímž byla získána sloučenina obecného vzorce (CCLIV). Chráněním sekundárního aminu pomocí FMOCCl a následnou hydrolyzou byla získána sloučenina obecného vzorce (CCLVI).

Příklad 15

- Na obrázku 15 byla 1,2-dihydroxypropanová kyselina obecného vzorce (CCLVII) spojena s N-hydroxylaminthyminem obecného vzorce (CCXLIX) čímž byla získána sloučenina obecného vzorce (CCLVIII), která pak byla převedena standardním postupem na fosforamiditový synthon obecného vzorce (CCLX). Sloučenina obecného vzorce (CCXLIX) byla také spojena s kyselinou adipovou a převedena na nukleokyselinový stavební blok obecného vzorce (CCLIV).

Příklad 16

- Na obrázku 16 byl nejprve syntetizován stavební blok obecného vzorce (CCLXVII) ze sloučenin obecného vzorce (CCLIX) a (CCLXV) stejným postupem, který byl použit v obrázku 1. Spojením sloučenin obecného vzorce (CCLXX) a (CCLIX) byla získána sloučenina obecného vzorce (CCLXXI). Reakcí sloučeniny obecného vzorce (CCLXVIII) se sloučeninou obecného vzorce (CCLIX) byla získána sloučenina obecného vzorce (CCLXIX), která po kondenzaci se sloučeninou obecného vzorce (CCLXXI) poskytla dimer (CCLXXII).

Příklad 17

Na obrázku 17 byl spojen aldehyd obecného vzorce (CCLXXIII) a glycin benzylester čímž byla získána sloučenina obecného vzorce (CCLXXIV). Reakcí sloučeniny obecného vzorce (CCLXXIV) se sloučeninou obecného vzorce (CXXXVIII) byla získána sloučenina obecného vzorce (CCLXXVI), která poskytla reakcí s kyselinou octovou sloučeninu obecného vzorce (CCLXXIX). Mitsunobuovou alkylací sloučeniny obecného vzorce (CCLXXIX) Boc-NH-O-acetylhydroxylaminem byla získána sloučenina obecného vzorce (CCLXXVIII), která po hydrogenaci poskytla stavební blok obecného vzorce (CCLXXXI). Podobně, spojením sloučeniny obecného vzorce (CCLXXIV) se sloučeninou obecného vzorce (CXLIV) a stejnými reakcemi byl získán synthon obecného vzorce (CCLXXX).

Příklad 18

Na obrázku 18 byla reduktivní aminací aldehydu obecného vzorce (CCLXXIII) a Boc-NH-O-benzylhydroxylaminu získána sloučenina obecného vzorce (CCLXXXII). Po hydrogenaci sloučeniny obecného vzorce (CCLXXXII) následovala alkylace sloučeniny obecného vzorce (CCLXXXIII) glykolovou kyselinou obecného vzorce (CCLXXXIV) (Borer, B.C. a Balogh, D.C., *Tetrahedron Letts.*, 1991, 32, 1039) čímž byla získána sloučenina obecného vzorce (CCLXXXV). Reakcí sloučeniny obecného vzorce (CCLXXXV) s TFA byla odstraněna chránicí skupina Boc a po spojení byla získána sloučenina obecného vzorce (CCLXXXVI). Chránicí skupina hydroxyly ve sloučenině obecného vzorce (CCLXXXVI) byla selektivně odstraněna kyselinou octovou čímž byla získána sloučenina obecného vzorce (CCLXXXVII). Sloučenina obecného vzorce (CCLXXXVII) pak byla převedena za standardních reakčních podmínek na stavební blok obecného vzorce (CCLXXXVIII). Podobně byl stavební blok obecného vzorce (CCLXXXIX) připraven spojením sloučeniny obecného vzorce (CCLXXXV) se sloučeninou obecného vzorce (CXLIV) a dále stejným postupem, který byl použit pro přípravu sloučeniny obecného vzorce (CCLXXXVIII).

Příklad 19

Na obrázku 19 byla alkylací thymin-N-hydroxylaminu obecného vzorce (CCXCI) alkoholem (CCXCIII) získána sloučenina obecného vzorce (CCXCIV). Sloučenina obecného vzorce (CCXCIV) byla převedena na fosforamiditový stavební blok obecného vzorce (CCXCVII) stejným postupem, který byl použit v obrázku 1.

Příklad 20

Na obrázku 20 byl první meziprodukt obecného vzorce (CCC) připraven z kyseliny glutamové za standardních reakčních podmínek. Alkylací thyminu sloučeninou obecného vzorce (CCC) byla získána sloučenina obecného vzorce (CCCI), která po reakci s TFA poskytla sloučeninu obecného vzorce (CCCII). Meziprodukt obecného vzorce (CCCII) byl spojen s Boc-glycinem na sloučeninu obecného vzorce (CCCIV), která po hydrolýze poskytla monomerní synthon obecného vzorce (CCCV). Podobně byla sloučenina obecného vzorce (CCCIII) připravena spojením sloučeniny obecného vzorce (CCXLIX) a Boc-aminoacetaldehydu a následnou hydrolýzou benzylesteru.

40 Příklad 21

Na obrázku 21 byl meziprodukt obecného vzorce (CCCIX) připraven z Boc-NH-O-benzylhydroxylaminu a sloučeniny obecného vzorce (CCCVI) za standardních reakčních podmínek. Hydrogenací sloučeniny obecného vzorce (CCCVIII) a spojením s N-hydroxythyminem

obecného vzorce (CCXLVII) byla získána sloučenina obecného vzorce (CCCIX). Odstraněním chránicí skupiny THP, dimethoxytritylací a fosfitylací byl získán stavební blok obecného vzorce (CCCXII). Podobně sloučeninu obecného vzorce (CCCXIII) lze připravit stejným postupem s tím rozdílem, že byl použit THP-hydroxyacetaldehyd místo THP-hydroxyoctové kyseliny.

5 Příklad 22

Na obrázku 22 byl připraven stavební blok obecného vzorce (CCCXIX) ze známé výchozí sloučeniny obecného vzorce (CCCXIV) a dále postupem vyobrazeným ve spodní části obrázku 22.

Příklad 23

- 10 Na obrázku 23 byl připraven stavební blok obecného vzorce (CCCXXIX) z výchozí sloučeniny obecného vzorce (CCCXX) a dále postupem vyobrazeným ve spodní části obrázku 23.

Příklad 24

Na obrázku 24 byla výchozí sloučenina obecného vzorce (CCCXXX) převedena na stavební blok obecného vzorce (CCCXXXVIII) postupem vyobrazeným ve spodní části obrázku 24.

15 Příklad 25

Sloučeniny použité a vyráběné v tomto příkladu jsou vyobrazeny na obrázku 1.

Serin strukturního vzorce (CXXXVIII):

- Thymin (37,8 g, 300 mmol) byl rozpuštěn v roztoku hydroxidu draselného (64,5 g, 1150 mmol) ve 200 ml vody. Během 1 hodiny byl k tomuto roztoku ohřátému na vodní lázni na 40 °C přidán
20 roztok kyseliny bromoctové (62,5 g, 450 mmol) ve 100 ml vody. Reakční směs byla při uvedené teplotě míchána ještě 1 hodinu. Pak byla ponechána vychladnout na laboratorní teplotu a pH bylo pomocí koncentrované HCl upraveno na 5,5. Roztok pak byl chlazen po dobu 2 h v lednici. Sraženina (nezreagovaný thymin) byla odfiltrována. Pomocí koncentrované HCl bylo pH roztoku upraveno na 2 a roztok byl umístěn na dobu 2 h do mrazáku. Bílá sraženina byla odfiltrována a
25 vysušena ve vakuové píci při 40 °C po dobu 6 h. Výtěžek byl 44 g (88 %).

N-Boc-L-serin methylester strukturního vzorce (CXXXIII):

- L-serin methylester (15,6 g, 100 mmol) byl za laboratorní teploty suspendován ve směsi THF/DMF (100 ml/100 ml). Za míchání byl do této směsi přidán triethylamin (11,13 g, 110 mmol) a di-tert.-butyldikarbonát (24,0 g, 110 mmol) a míchání pokračovalo za laboratorní
30 teploty po dobu 30 minut. Bylo přidáno 20 ml vody a roztok byl míchán za laboratorní teploty po dobu 8 h. Roztok byl odpařen do sucha. Odparek byl suspendován v ethylacetátu (250 ml) a ponechán reagovat s hydrogensíranem draselným (0,25 N roztok, 100 ml). Produkt byl extrahován ethylacetátem. Organický extrakt byl promyt vodou (100 ml), nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml) a vysušen bezvodým síranem sodným. Odpařením organického
35 rozpouštědla byl získán olejovitý odparek v množství 26 g (90 %).

N-Boc-L-serin(OTHP) methylester strukturního vzorce (CXXXIV):

- N-Boc-L-serin methylester strukturního vzorce (CXXXIII) (15 g, 68,49 mmol) byl rozpuštěn v suchém CH₂Cl₂ (100 ml) a ponechán reagovat s 3,4-dihydro-2H-pyranem (8,4 g, 100 mmol) a katalytickým množstvím kyseliny p.-toluensulfonové (100 mg) za laboratorní teploty. Reakční
40 směs byla ponechána míchat za laboratorní teploty po dobu 12 hodin a odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (200 ml), promyt 5% roztokem NaHCO₃ (100 ml), vodou

(50 ml) a nasyceným roztokem soli (50 ml). Organický extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha. Odparek měl dostatečnou čistotu, aby bylo možné jej použít ihned do dalšího kroku. Výtěžek 15 g (72 %).

N-Boc-L-serinol(OTHP) strukturního vzorce (CXXXV):

- 5 Serin(OTHP) methylester (10 g, 33 mmol) byl rozpuštěn v suchém THF (100 ml) a ochlazen na 0 °C ledovou lázní pod argonovou atmosférou. K tomuto studenému roztoku byl za míchání během 1 hodiny při 0 °C přidán boran-methylsulfidový komplex (2 M roztok v THF, 100 ml, 200 mmol). Po přidání boranu byla reakční směs ponechána ohřát na laboratorní teplotu a zahřívána po dobu 6 hodin na 40 °C. Pak byla reakční směs vychlazena na 0 °C, neutralizována
- 10 vodou a kyselinou octovou na pH 6 až 7 a extrahována etherem (3 × 100 ml). Etherový extrakt byl promyt vodou (2 × 100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml), vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž byl získán surový produkt ve formě oleje. Olej byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází hexan → aceton, čímž bylo získáno 8 g (88 %) čistého produktu.

- 15 **N-Boc-L-serin(OTHP) OIb strukturního vzorce (CXXXVI):**

- K míchanému roztoku N-Boc-L-serinolu(OTHP) strukturního vzorce (CXXXV) (8 g, 29,09 mmol) v suchém CH₂Cl₂ (100 ml) při 0 °C byl během 30 minut přidán TEA (3,54 g, 35 mmol) a isobutyrylchlorid (3,71 g, 35 mmol). Pak byla reakční směs míchána po dobu 4 hodin za laboratorní teploty a odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (200 ml)
- 20 promyt 5% roztokem NaHCO₃ (100 ml), vodou (50 ml) a nasyceným roztokem soli (50 ml). Organický extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž byl získán surový produkt ve formě oleje. Olej byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází hexan → aceton, čímž bylo získáno 7,9 g (79 %) čistého produktu.

L-serinol(OIb) strukturního vzorce (CXXXVII):

- 25 N-Boc-L-serin(OTHP) OIb strukturního vzorce (CXXXVI) (10 g, 28,98 mmol) byl rozpuštěn v CH₂Cl₂ (100 ml), ponechán míchat za laboratorní teploty s TFA (50 ml) po dobu 1 hodiny a odpařen do sucha. Odparek byl rozpuštěn v methanolu (50 ml) a opět odpařen. Odparek byl rozpuštěn v CH₂Cl₂ (200 ml), promyt nasyceným roztokem NaHCO₃ (2 × 100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen
- 30 bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž bylo získáno 4,5 g (96 %) produktu ve formě oleje.

N-(thyminylacetyl)-L-serinol(OIb) strukturního vzorce (CXXXIX):

- Thyminoctová kyselina strukturního vzorce (CXXXVIII) (7,3 g, 40 mmol) a N-methylmorpholin (4,4 ml, 40 mmol) byl rozpuštěn ve 100 ml DMF. Roztok byl pod argonovou atmosférou ochlazen na -20 °C. K tomuto vychlazenému míchanému roztoku byl najednou přidán isobutylchloroformiát (5,2 ml, 40 mmol). Po 15 minutách byl přidán roztok L-serinolu(OIb) strukturního vzorce (CXXXVII) (6,44 g, 40 mmol) ve 30 ml DMF (ochlazen na stejnou teplotu). Reakční směs byla míchána při teplotě -20 °C po dobu 30 minut, ohřáta na laboratorní
- 40 teplotu a v míchání bylo pokračováno další hodinu. Reakční směs byla odpařena do sucha a odparek rozpuštěn v CH₂Cl₂ (200 ml). Organický roztok byl promyt 5% roztokem NaHCO₃ (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž byl získán surový produkt ve formě pěny. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH₂Cl₂ → aceton, čímž bylo získáno 12 g (92 %) čistého produktu.

- 45 **4,4'-dimethoxytrityl-N-(thyminylacetyl)-L-serinol(OIb) strukturního vzorce (CXL):**

- N-(thyminylacetyl)-L-serinol(OIb) strukturního vzorce (CXXXIX) (10 g, 30,58 mmol) byl koodpařen se suchým pyridinem (3 × 50 ml) a rozpuštěn v suchém pyridinu (100 ml). K tomuto roztoku byl přidán TEA (3,54 g, 35 mmol) a DMTCl (11,83 g, 35 mmol) za laboratorní teploty pod argonovou atmosférou. Reakční směs byla míchána po dobu 12 hodin, reakce ukončena
- 50 methanolem (20 ml) a vše dále mícháno po dobu 30 minut. Roztok byl odpařen do sucha a

rozpuštěn v CH_2Cl_2 (200 ml). Organický roztok byl promyt 5% roztokem NaHCO_3 (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž byl získán surový produkt ve formě pěny. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow$ aceton, čímž bylo získáno 17 g (88 %) čistého produktu.

1-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-[amino(thyminylacetyl)]-L-propan-1,3-diol strukturního vzorce (CXLI):

4,4'-dimethoxytrityl-N-(thyminylacetyl)-L-serinol(OIb) strukturního vzorce (CXL) (10 g, 15,89 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (20 ml). k tomuto roztoku byl přidán 1 N roztok NaOH (20 ml, 20 mmol) při teplotě 0 °C. Reakční směs byla míchána po dobu 1 hodiny, reakce byla ukončena kyselinou octovou, kterou bylo pH reakční směsi upraveno na 7. Roztok byl extrahován ethylacetátem (2 × 100 ml). Organický roztok byl promyt 5% roztokem NaHCO_3 (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž byl získán surový produkt ve formě pěny. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow$ aceton, čímž bylo získáno 8,2 g (92 %) čistého produktu.

1'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-[amino(thyminylacetyl)]-L-propan-3'-O-(N,N-diisopropyl)-β-kyanoethylfosforamidit strukturního vzorce (CXLI):

1-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-[amino(thyminylacetyl)]-L-propan-1,3-diol strukturního vzorce (CXLI) (8,00 g, 14,31 mmol) byl koodpařen se suchým pyridinem (3 × 50 ml) a sušen za sníženého tlaku přes noc nad pevným NaOH . Vysušený materiál byl rozpuštěn v suchém CH_2Cl_2 (100 ml) a ochlazen na 0 °C pod argonovou atmosférou. K tomuto ochlazenému roztoku byl přidán N,N-diisopropylethylamin (5,23 g, 25 mmol) a 2-kyanoethyl-N,N-diisopropylchlorofosforamidit (4,72 g, 20,00 mmol) pod argonovou atmosférou. Reakční směs byla míchána 1 hodinu při 0 °C a pak 1 hodinu při laboratorní teplotě. Reakční směs byla zředěna CH_2Cl_2 (100 ml). Roztok CH_2Cl_2 byl promyt 5% roztokem NaHCO_3 (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Extrakt CH_2Cl_2 byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž byl získán surový produkt ve formě pěny. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow$ aceton s přidávkou 0,1 % TEA, čímž bylo získáno 10 g (x%) čistého produktu. Ten byl sušen za sníženého tlaku přes noc nad pevným NaOH . Pak byl rozpuštěn v CH_2Cl_2 (15 ml) a během 1 hodiny pod argonovou atmosférou přikapán do míchaného roztoku suchého hexanu (2000 ml). Po přidání CH_2Cl_2 roztoku byla vzniklá sraženina míchána po dobu další 1 hodiny, odfiltrována, promyta suchým hexanem (200 ml) a vysušena přes noc nad pevným NaOH . Výtěžek: 9,5 g (87 %).

Příklad 26

(Viz obrázek 26)

N-(tert.-butyloxykarbonyl)-O-benzyl-L-serin strukturního vzorce (CXC):

O-benzyl-L-serin strukturního vzorce (CLXXXIX) (10 g, 51,28 mmol) byl za laboratorní teploty suspendován ve směsi THF/ H_2O (8 : 2, 100 ml). K této směsi byl za míchání přidán triethylamin (6,06 g, 60 mmol) a di-tert.-butyldikarbonát (13,08 g, 60 mmol) a míchání pokračovalo za laboratorní teploty přes noc. Homogenní roztok byl odpařen do sucha a odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (300 ml). Organický extrakt byl promyt 0,5 N roztokem hydrogensíranu draselného (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž bylo získáno 14 g (93%) olejovitého odparku.

N-(tert.-butyloxykarbonyl)-O-benzyl-L-serinol strukturního vzorce (CXCI):

N-(tert.-butyloxykarbonyl)-O-benzyl-L-serin strukturního vzorce (CXC) (6,0 g, 20,34 mmol) byl rozpuštěn v suchém THF pod argonovou atmosférou a ochlazen na -20 °C. K tomuto vychlazenému míchanému roztoku byl přidán TEA (2,32 g, 23 mmol) a isobutyrylchloroformiát

(3,13 g, 23 mmol). Míchání pokračovalo po dobu dalších 30 minut při -20 °C pod argonovou atmosférou. Reakční směs byla ihned přefiltrována pod argonovou atmosférou, sraženina byla promyta suchým THF (50 ml). Spojené filtráty byly pomalu během 10 minut přidány do studeného (0 °C) roztoku NaBH₄ (7,4 g, 200 mmol) ve směsi THF : voda (8 : 2, 200 ml). Po přidání byla reakční směs míchána po dobu 2 hodin při 0 °C a pH reakční směsi bylo upraveno na 7 pomocí kyseliny octové. Roztok byl odpařen do sucha, rozdělen mezi ethylacetát a vodu (300 : 150 ml) a extrahován ethylacetátem. Organický extrakt byl promyt nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml), vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH₂Cl₂ → ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 4,7 g (82 %) čistého produktu ve formě oleje. ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,41 (s, 9H, Boc), 3,60-3,70 (m, 4H), 3,82 (d, 2H), 4,53 (s, 2H, OCH₂Ph), 5,20 (bs, 1H, NH) a 7,30-7,40 (m, 5H, Ph).

N-(tert.-butyloxykarbonyl)-O-benzyl-L-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CXCII):

K suchému roztoku N-(tert.-butyloxykarbonyl)-O-benzyl-L-serinolu strukturního vzorce (CXCI) (4,3 g, 14,3 mmol) v suchém pyridinu (50 ml) byl za laboratorní teploty přidán TEA (2,02 g, 20 mmol). K tomuto míchanému roztoku byl přidán anhydrid kyseliny isobutyrové (3,16 g, 20 mmol) a míchání pokračovalo přes noc pod argonovou atmosférou. Reakční směs byla odpařena do sucha, rozdělena mezi ethylacetát (100 ml) a NaHCO₃ (5% roztok, 100 ml) a extrahována ethylacetátem. Organický extrakt byl promyt vodou (100 ml), nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml) a vysušen bezvodým síranem sodným. Vysušený roztok byl odpařen do sucha, čímž byl získán surový odparek. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází hexan → ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 4,5 g (84 %) čistého produktu ve formě oleje. ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,04 (d, 6H, IbCH₂), 1,39 (s, 9H, Boc), 2,46 (m, 1H, IbCH), 3,40 (m, 2H), 3,92 (m, 2H), 4,12 (m, 1H), 4,46 (s, 2H, OCH₂Ph), 6,84 (d, 1H, NH) a 7,24-7,40 (m, 5H, Ph).

N-(thyminylacetyl)-O-benzyl-L-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CXCIV):

N-(tert.-butyloxykarbonyl)-O-benzyl-L-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CXCII) (4,3 g, 12,18 mmol) byl ponechán míchat po dobu 30 minut za laboratorní teploty ve směsi kyseliny trichloroctové (20 ml) a CH₂Cl₂ (20 ml). Reakční směs byla odpařena do sucha, rozpuštěna v CH₃OH (10 ml) a opět odpařena do sucha. Odparek byl po dobu 12 hodin sušen za sníženého tlaku nad pevným KOH. Vysušený odparek byl bez charakterizace použit pro další reakci.

Thyminoctová kyselina strukturního vzorce (CXCIII) (2,76 g, 15 mmol) byla rozpuštěna v suchém DMF (75 ml) a ochlazená pod argonovou atmosférou na -20 °C. K tomuto vychlazenému míchanému roztoku byl přidán N-methylmorfolin (1,72 g, 17 mmol) a isobutylchloroformiát (2,13 ml, 17 mmol). Po 15 minutách míchání byl roztok TFA soli vyrobené postupem popsáním v předešlém odstavci v suchém DMF (50 ml) neutralizován N-methylmorfolinem (1,72 g, 17 mmol) a najednou přidán do studeného míchaného roztoku thyminoctové kyseliny. Reakční směs byla míchána při teplotě -20 °C po dobu 1 hodiny, ohřáta na laboratorní teplotu a v míchání bylo pokračováno přes noc. Roztok byl odpařena do sucha a odparek rozpuštěn v CH₂Cl₂ (250 ml) a vodě (100 ml) a extrahován CH₂Cl₂. Organický extrakt byl promyt 5% roztokem NaHCO₃ (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen a odpařen do sucha, čímž byl získán surový produkt. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH₂Cl₂ → aceton. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 4,8 g (94 %) čistého produktu. Čistý produkt byl krystalizován ze směsi CH₂Cl₂ / hexan, čímž byla získána sloučenina o teplotě tání 122 °C až 124 °C. ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,04 (d, 6H, IbCH₂), 1,72 (s, 3H, CH₃), 2,44 (m, 1H, IbCH), 3,42 (m, 2H), 4,06 (m, 2H), 4,18 (m, 1H), 4,30 (s, 2H), 4,46 (s, 2H, OCH₂Ph), 7,24-7,40 (m, 6H, C₆H a Ph), 8,22 (d, 1H, NH) a 11,22 (s, 1H, NH).

N-(thyminylacetyl)-L-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CXCIV):

N-(thyminylacetyl)-O-benzyl-L-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CXCIV) (2,08 g, 5 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu (50 ml). K tomuto roztoku byl za laboratorní teploty přidán $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (0,6 g) a cyklohexen (5 ml). Reakční směs pak byla zahřívána po dobu 12 hodin na teplotu 70 °C. Katalyzátor byl odfiltrován a promyt methanolem (20 ml). Filtrát byl odpařen do sucha čímž byla získána bílá pevná látka, která byla rozpuštěna v minimálním množství methanolu a ochlazena na laboratorní teplotu. Produkt krystalizuje ve formě jemného prášku o teplotě tání: 196 °C až 198 °C. Výtěžek: 1,48 g (91 %). $^1\text{HNMR}$ ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_2), 1,72 (s, 3H, CH_3), 2,42 (m, 1H, IbCH), 3,40 (m, 2H), 3,94 (m, 2H), 4,06 (m, 1H), 4,28 (s, 2H), 4,90 (t, 1H, OH), 7,20 (s, 1H, C_6H), 8,12 (d, 1H, NH) a 11,22 (s, 1H, NH).

4,4'-dimethoxytrityl-N-(thyminylacetyl)-L-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CXCVI):

N-(thyminylacetyl)-L-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CXCIV) (1,48 g, 4,5 mmol) byl rozpuštěn v suchém pyridinu (50 ml) pod argonovou atmosférou. K tomuto míchanému roztoku byl přidán TEA (0,51 g, 5 mmol) a N,N-dimethylaminopyridin (0,10 g). Po 10 minutách byl přidán 4,4'-dimethoxytritylchlorid (1,69 g, 5 mmol) a míchání pokračovalo za laboratorní teploty pod argonovou atmosférou přes noc. Reakce byla ukončena methanolem (10 ml), vše dále mícháno po dobu 10 minut a odpařeno do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (200 ml), promyt 5% roztokem NaHCO_3 (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow$ ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 2,5 g (88 %) pěny. $^1\text{HNMR}$ (CDCl_3): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_2), 1,72 (s, 3H, CH_3), 2,40 (m, 1H, IbCH), 3,38 (m, 2H), 3,72 (s, 6H, 2 OCH_3), 4,12 (m, 2H), 4,20 (m, 1H), 4,32 (d, 2H), 6,84 (m, 4H, Ph), 7,20-7,40 (m, 12H, C_6H a Ph), 8,30 (d, 1H, NH) a 11,28 (s, 1H, NH).

1-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-[amino(thyminylacetyl)]-L-propan-1,3-diol strukturního vzorce (CXCVII):

4,4'-dimethoxytrityl-N-(thyminylacetyl)-L-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CXCVI) (3,4 g, 5,41 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (30 ml) a ochlazen ledovou lázní na 0 °C. K tomuto studenému míchanému roztoku byl přidán 2 N NaOH (10 ml, 20 mmol) a míchání pokračovalo po dobu 30 minut při 0 °C. Pomocí kyseliny octové bylo pH roztoku upraveno na 7. Odparek byl rozdělen mezi vodu (50 ml) a CH_2Cl_2 (150 ml) a extrahován CH_2Cl_2 . Vodná vrstva byla opět extrahována CH_2Cl_2 (50 ml). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml) vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny do sucha. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow$ aceton. Výtěžek: 3,0 g (99 %). $^1\text{HNMR}$ (CDCl_3): δ 1,72 (s, 3H, CH_3), 3,0 (m, 2H), 3,42 (m, 2H), 3,72 (s, 6H, 2 OCH_3), 3,94 (m, 1H), 4,32 (d, 2H), 4,68 (m, 1H, OH), 6,84 (m, 4H, Ph), 7,20-7,40 (m, 12H, C_6H a Ph), 8,06 (d, 1H, NH) a 11,28 (bs, 1H, NH).

1-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-[amino(thyminylacetyl)]-L-propan-3-O-(N,N-diisopropyl)- β -kyanoethylfosforamidit strukturního vzorce (CXCVIII):

1-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-[amino(thyminylacetyl)]-L-propan-1,3-diol strukturního vzorce (CXCVII) (3,1 g, 5,55 mmol) byl vysušen za sníženého tlaku přes noc nad pevným NaOH a rozpuštěn v suchém CH_2Cl_2 (100 ml). Roztok byl ochlazen na 0 °C pod argonovou atmosférou. K tomuto ochlazenému roztoku byl za míchání přidán N,N-diisopropylethylamin (1,29 g, 10 mmol) a 2-kyanoethyl-N,N-diisopropylchlorofosforamidit (1,96 g, 8,3 mmol). Reakční směs byla míchána 1 hodinu při 0 °C a pak 2 hodiny při laboratorní teplotě. Reakční směs byla zředěna CH_2Cl_2 (100 ml) a organická vrstva byla promyta 5% roztokem NaHCO_3 (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Extrakt CH_2Cl_2 byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž byl získán olejovitý odparek. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow$ ethylacetát s přídatkem 0,1% TEA. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž byla získána pěna. Ta byla sušena za sníženého tlaku přes noc nad pevným NaOH. Vysušená pěna

byla rozpuštěna v suchém CH_2Cl_2 (20 ml) a během 1 hodiny pod argonovou atmosférou přikapána do míchaného roztoku suchého hexanu (2000 ml). Po přidání CH_2Cl_2 roztoku byla vzniklá sraženina míchána po dobu další 1 hodiny, odfiltrována, promyta suchým hexanem (100 ml) a vysušena po dobu 4 hodin nad pevným NaOH za sníženého tlaku. Výtěžek: 3,5 g (83 %).

Příklad 27

(Viz obrázek 27)

N-(tert.-butyloxykarbonyl)-O-benzyl-D-serin strukturního vzorce (CC):

O-benzyl-D-serin strukturního vzorce (CXCIX) (5 g, 25,64 mmol) byl za laboratorní teploty suspendován ve směsi THF/ H_2O (8 : 2, 70 ml). K této směsi byl za míchání přidán triethylamin (4,04 g, 40 mmol) a di-tert.-butyldikarbonát (6,54 g, 30 mmol) a míchání pokračovalo za laboratorní teploty přes noc. Homogenní roztok byl odpařen do sucha a odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (150 ml). Organický extrakt byl promyt 0,5 N roztokem hydrogensíranu draselného (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Ethylacetátový extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž bylo získáno 7,56 g (100 %) olejovitého odparku.

N-(tert.-butyloxykarbonyl)-O-benzyl-D-serinol strukturního vzorce (CCI):

N-(tert.-butyloxykarbonyl)-O-benzyl-D-serin strukturního vzorce (CC) (7,56 g, 25,63 mmol) byl rozpuštěn v suchém THF pod argonovou atmosférou ochlazen na -20°C . K tomuto vychlazenému míchanému roztoku byl přidán TEA (3,03 g, 30 mmol) a isobutyrylchloroformiát (4,08 g, 30 mmol). Míchání pokračovalo po dobu dalších 30 minut při -20°C pod argonovou atmosférou. Reakční směs byla ihned přefiltrována pod argonovou atmosférou, sraženina byla promyta suchým THF (50 ml). Spojené filtráty byly pomalu během 10 minut přidány do studeného (0°C) roztoku NaBH_4 (7,4 g, 200 mmol) ve směsi THF : voda (8 : 2, 200 ml). Po přidání byla reakční směs míchána po dobu 2 hodin při 0°C a pH reakční směsi bylo upraveno na 7 pomocí kyseliny octové. Roztok byl odpařen do sucha, rozdělen mezi ethylacetát a vodu (300 : 150 ml) a extrahován ethylacetátem. Organický extrakt byl promyt nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml), vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow$ ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 6,68 g (92 %) čistého produktu ve formě oleje. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,41 (s, 9H, Boc), 3,60-3,70 (m, 4H), 3,82 (d, 2H), 4,53 (s, 2H, OCH_2Ph), 5,20 (bs, 1H, NH) a 7,30-7,40 (m, 5H, Ph).

N-(tert.-butyloxykarbonyl)-O-benzyl-D-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CCII):

K suchému roztoku N-(tert.-butyloxykarbonyl)-O-benzyl-D-serinolu strukturního vzorce (CCI) (6,6 g, 23,5 mmol) v suchém pyridinu (50 ml) byl za laboratorní teploty přidán TEA (3,03 g, 30 mmol). K tomuto míchanému roztoku byl přidán anhydrid kyseliny isobutyrové (4,74 g, 30 mmol) a míchání pokračovalo přes noc pod argonovou atmosférou. Reakční směs byla odpařena do sucha, rozdělena mezi ethylacetát (200 ml) a NaHCO_3 (5% roztok, 100 ml) a extrahována ethylacetátem. Organický extrakt byl promyt vodou (100 ml), nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml) a vysušen bezvodým síranem sodným. Vysušený roztok byl odpařen do sucha, čímž byl získán surový odparek. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází hexan $\rightarrow$ ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 8,0 g (97 %) čistého produktu ve formě oleje. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_2), 1,39 (s, 9H, Boc), 2,46 (m, 1H, IbCH), 3,40 (m, 2H), 3,92 (m, 2H), 4,12 (m, 1H), 4,46 (s, 2H, OCH_2Ph), 6,84 (d, 1H, NH) a 7,24-7,40 (m, 5H, Ph).

N-(thyminylacetyl)-O-benzyl-D-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CCIII):

N-(tert.-butyloxykarbonyl)-O-benzyl-D-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CCII) (5,0 g, 14,25 mmol) byl ponechán míchat po dobu 30 minut za laboratorní teploty ve směsi kyseliny trichloroctové (20 ml) a CH_2Cl_2 (20 ml). Reakční směs byla odpařena do sucha, rozpuštěna v

suchém CH_3OH (10 ml) a opět odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v CH_2Cl_2 (150 ml), pH bylo pomocí 5% roztoku NaHCO_3 upraveno na 7 a roztok byl extrahován CH_2Cl_2 . Organická vrstva byla promyta vodou (50 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Extrakt CH_2Cl_2 byl vysušen a odpařen do sucha. Odparek byl po dobu 12 hodin sušen za sníženého tlaku nad pevným KOH. Vysušený odparek byl bez charakterizace použit pro další reakci.

Thyminoctová kyselina strukturního vzorce (CXCI) (2,57 g, 14 mmol) byla rozpuštěna v suchém DMF (50 ml) a ochlazena pod argonovou atmosférou na -20°C . K tomuto vychlazenému míchanému roztoku byl přidán N-methylmorpholin (1,52 g, 15 mmol) a isobutylchloroformiát (2,04 ml, 15 mmol). Po 15 minutách míchání byl roztok aminu vyrobeného postupem popsaným v předešlém odstavci v suchém DMF (50 ml) najednou přidán do studeného míchaného roztoku thyminoctové kyseliny. Reakční směs byla míchána při teplotě -20°C po dobu 1 hodiny, ohřáta na laboratorní teplotu a v míchání bylo pokračováno přes noc. Roztok byl odpařena do sucha a odparek rozpuštěn v CH_2Cl_2 (250 ml) a vodě (100 ml) a extrahován CH_2Cl_2 . Organický extrakt byl promyt 5% roztokem NaHCO_3 (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen a odpařen do sucha, čímž byl získán surový produkt. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow$ aceton. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 2,8 g (54 %) čistého produktu. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_3), 1,72 (s, 3H, CH_3), 2,44 (m, 1H, IbCH), 3,42 (m, 2H), 4,06 (m, 2H), 4,18 (m, 1H), 4,30 (s, 2H), 4,46 (s, 2H, OCH_2Ph), 7,24-7,40 (m, 6H, C_6H a Ph), 8,22 (d, 1H, NH) a 11,22 (s, 1H, NH).

Sloučenina uvedená v titulu byla také připravena postupem popsaným pro přípravu "L" izomeru. Použitá činidla: thyminoctová kyselina (2,2 g, 12 mmol); isobutylchloroformiát (1,77 g, 13 mmol); N-methylmorpholin (1,52 g, 15 mmol); TFA sůl (3,65 g, 10 mmol); N-methylmorpholin (1,5 g, 15 mmol) a suchý DMF (100 ml). Výtěžek: 3,5 g (84 %).

N-(thyminylacetyl)-D-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CCIV):

N-(thyminylacetyl)-O-benzyl-D-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CCIII) (3,5 g, 8,39 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu (50 ml). K tomuto roztoku byl za laboratorní teploty přidán $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (1,00 g) a cyklohexen (10 ml). Reakční směs pak byla zahřívána po dobu 12 hodin na teplotu 70°C . Katalyzátor byl odfiltrován a promyt methanolem (20 ml). Filtrát byl odpařen do sucha čímž byla získána bílá pevná látka. Výtěžek: 2,7 g (98 %). ^1H NMR ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_3), 1,72 (s, 3H, CH_3), 2,42 (m, 1H, IbCH), 3,40 (m, 2H), 3,94 (m, 2H), 4,06 (m, 1H), 4,28 (s, 2H), 4,90 (t, 1H, OH), 7,20 (s, 1H, C_6H), 8,12 (d, 1H, NH) a 11, 22 (s, 1H, NH).

4,4'-dimethoxytrityl-N-(thyminylacetyl)-D-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CCV):

N-(thyminylacetyl)-D-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CCIV) (2,7 g, 8,26 mmol) byl rozpuštěn v suchém pyridinu (50 ml) pod argonovou atmosférou. K tomuto míchanému roztoku byl přidán TEA (1,01 g, 10 mmol) a 4,4'-dimethoxytritylchlorid (3,38 g, 10 mmol) a míchání pokračovalo za laboratorní teploty pod argonovou atmosférou přes noc. Reakce byla ukončena methanolem (10 ml), vše dále mícháno po dobu 10 minut a odpařeno do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (250 ml), promyt 5% roztokem NaHCO_3 (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow$ ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 5,0 g (96 %) pěny. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_3), 1,72 (s, 3H, CH_3), 2,40 (m, 1H, IbCH), 3,38 (m, 2H), 3,72 (s, 6H, 2OCH_3), 4,12 (m, 2H), 4,20 (m, 1H), 4,32 (d, 2H), 6,84 (m, 4H, Ph), 7,20-7,40 (m, 12H, C_6H a Ph), 8,30 (d, 1H, NH) a 11,28 (s, 1H, NH).

1-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-[amino(thyminylacetyl)]-D-propan-1,3-diol strukturního vzorce (CCVI):

4,4'-dimethoxytrityl-N-(thyminylacetyl)-D-serinol-O-Ib strukturního vzorce (CCV) (5,0 g, 7,95 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (30 ml) a ochlazen ledovou lázní na 0°C . K tomuto studenému míchanému roztoku byl přidán 2 N NaOH (10 ml, 20 mmol) a míchání pokračovalo

po dobu 30 minut při 0 °C. Pomocí kyseliny octové bylo pH roztoku upraveno na 7 a pak byl roztok odpařen do sucha. Odparek byl rozdělen mezi vodu (50 ml) a CH₂Cl₂ (250 ml) a extrahován CH₂Cl₂. Vodná vrstva byla opět extrahována CH₂Cl₂ (50 ml). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml) vysušeny a odpařeny do sucha. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH₂Cl₂ → acetón. Výtěžek: 4,0 g (90 %). ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,72 (s, 3H, CH₃), 3,0 (m, 2H), 3,42 (m, 2H), 3,72 (s, 6H, 2.OCH₃), 3,94 (m, 1H), 4,32 (d, 2H), 4,68 (m, 1H, OH), 6,84 (m, 4H, Ph), 7,20-7,40 (m, 12H, C₆H a Ph), 8,06 (d, 1H, NH) a 11,28 (bs, 1H, NH).

1-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-[amino(thyminylacetyl)]-D-propan-3-O-(N,N-diisopropyl)-β-kyanoethylfosforamidit strukturního vzorce (CCVII):

1-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-[amino(thyminylacetyl)]-D-propan-1,3-diol strukturního vzorce (CCVI) (2,79 g, 5,0 mmol) byl vysušen za sníženého tlaku přes noc nad pevným NaOH a rozpuštěn v suchém CH₂Cl₂ (100 ml). Roztok byl ochlazen na 0 °C pod argonovou atmosférou. K tomuto ochlazenému roztoku byl za míchání přidán N,N-diisopropylethylamin (1,29 g, 10 mmol) a 2-kyanoethyl-N,N-diisopropylchlorofosforamidit (1,96 g, 8,3 mmol). Reakční směs byla míchána 1 hodinu při 0 °C a pak 2 hodiny při laboratorní teplotě. Reakční směs byla zředěna CH₂Cl₂ (100 ml) a organická vrstva byla promyta 5% roztokem NaHCO₃ (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Extrakt CH₂Cl₂ byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž byl získán olejovitý odparek. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH₂Cl₂ → ethylacetát s přídatkem 0,1 % TEA. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž byla získána pěna. Ta byla sušena za sníženého tlaku přes noc nad pevným NaOH. Vysušená pěna byla rozpuštěna v suchém CH₂Cl₂ (20 ml) a během 1 hodiny pod argonovou atmosférou přikapána do míchaného roztoku suchého hexanu (2000 ml). Po přidání CH₂Cl₂ roztoku byla vzniklá sraženina míchána po dobu další 1 hodiny, odfiltrována, promyta suchým hexanem (100 ml) a vysušena po dobu 4 hodin nad pevným NaOH za sníženého tlaku. Výtěžek: 3,3 g (87 %).

Příklad 28

(Viz obrázek 28)

1-O-benzyl-2-[(tert.-butyloxykarbonyl)amino]-3-[N₃-benzoyl-(thyminyl)-L-propanol strukturního vzorce (CCIX):

K míchanému roztoku N₃-benzoylthyminu strukturního vzorce (CCVIII) (5,75 g, 25 mmol) v suchém THF (200 ml) pod argonem byl přidán za laboratorní teploty trifenylofosfin (10,48 g, 40 mmol) a N_α-tert.-butyloxykarbonyl-β-benzyloxy-L-serinol strukturního vzorce (CXCI) (5,3 g, 18,86 mmol). Po 15 minutách byl pomalu během 30 minut přidán diethylazodikarboxylát (6,96 g, 40 mmol). Reakční směs byla zakryta alobalem a ponechána míchat pod argonovou atmosférou za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Rozpouštědlo bylo odpařeno a odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (300 ml). Organický extrakt byl promyt 5% roztokem NaHCO₃ (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml) a vysušen bezvodým Na₂SO₄. Vysušený ethylacetátový extrakt byl odpařen do sucha, čímž byl získán oranžový olej. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází hexan → ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny, čímž byl získán světle růžový olej. Výtěžek: 8,0 g (86 %). ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,41 (s, 9H, Boc), 1,72 (s, 3H, CH₃), 3,56 (m, 2H), 4,20 (m, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,52 (d, 2H, OCH₂Ph), 5,20 (d, 1H, NH), 7,06 (s, 1H, C₆H) a 7,20-7,60 (m, 10H, Ph).

2-[(tert.-butyloxykarbonyl)amino]-3-[N₃-benzoyl(thyminyl)-L-propan-1-ol strukturního vzorce (CCX):

K 1-O-benzyl-2-[(tert.-butyloxykarbonyl)amino]-3-[N₃-benzoyl(thyminyl)-L-propanolu strukturního vzorce (CCIX) (4,93 g, 10 mmol) rozpuštěném v methanolu (100 ml) bylo přidáno Pd/C

(10 %, 1 g). Reakční směs byla hydrogenována při 345 kPa vodíku po dobu 12 hodin. Katalyzátor byl odfiltrován, promyt methanolem (50 ml) a filtrát byl odpařen do sucha. Odparek byl krystalizován ze směsi aceton/hexan, čímž bylo získáno 3,70 g, (92 %) čistého produktu o teplotě tání: 156 °C až 159 °C. ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,42 (s, 9H, Boc), 1,94 (s, 3H, CH₃), 3,64 (m, 4H), 3,84 (m, 1H), 4,14 (m, 1H), 5,22 (d, 1H, NH), 7,18 (s, 1H, C₆H), 7,48 (t, 2H, Ph), 7,62 (t, 1H, Ph) a 7,98 (d, 2H, Ph).

1-O-isobutyryl-2-[(tert.-butyloxykarbonyl)amino]-3-[N₃-benzoyl(thyminy)]-L-propanol strukturního vzorce (CCXI):

2-[(tert.-butyloxykarbonyl)amino]-3-[N₃-benzoyl(thyminy)]-L-propan-1-ol strukturního vzorce (CCIX) (1,60 g, 3,97 mmol) byl rozpuštěn v suchém pyridinu (30 ml) a ponechán míchat za laboratorní teploty pod argonovou atmosférou. K tomuto míchanému roztoku byl přidán TEA (0,51 g, 5 mmol) a anhydrid kyseliny isobutyrové (0,79 g, 5 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 12 hodin a odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (150 ml) a promyt NaHCO₃ (5% roztok, 100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen a odpařen do sucha. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH₂Cl₂ → ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 1,6 g (85 %) čistého produktu ve formě pěny. Čistý produkt byl krystalizován ze směsi aceton/hexan, čímž byla získána látka o teplotě tání 165 °C až 167 °C. ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,16 (d, 6H, IbCH₃), 1,42 (s, 9H, Boc), 1,94 (s, 3H, CH₃), 2,52 (m, 1H), 3,64 (m, 4H), 3,84 (m, 1H), 4,14 (m, 1H), 5,22 (d, 1H, NH), 7,18 (s, 1H, C₆H), 7,48 (t, 2H, Ph), 7,62 (t, 1H, Ph) a 7,98 (d, 2H, Ph).

1-O-isobutyryl-2-[(β-hydroxyacetyl)amino]-3-[N₃-benzoyl(thyminy)]-L-propanol strukturního vzorce (CCXII):

1-O-isobutyryl-2-[(tert.-butyloxykarbonyl)amino]-3-[N₃-benzoyl(thyminy)]-L-propanol strukturního vzorce (CCXI) (1,6 g, 3,38 mmol) byl ponechán míchat po dobu 30 minut za laboratorní teploty ve směsi TFA (5 ml) a CH₂Cl₂ (10 ml) a odpařen do sucha. Odparek byl rozpuštěn v suchém CH₃OH (10 ml) a opět odpařen. Odparek byl přes noc sušen za sníženého tlaku nad pevným NaOH. Vysušený odparek byl bez charakterizace použit pro další reakci.

K míchanému roztoku kyseliny glykolové (0,53 g, 7 mmol) v suchém DMF (50 ml) byl přidán 1-hydroxybenzotriazol (0,67 g, 5 mmol) a hydrochlorid 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimidu (EDC) (1,91 g, 10 mmol). Po 15 minutách míchání byl za laboratorní teploty přidán TEA (1,01 g, 10 mmol) a TFA sůl vyrobená postupem popsáním v předešlém odstavci v DMF (20 ml). Reakční směs byla míchána po dobu 12 hodin a odpařena do sucha. Odparek byl rozdělen mezi CH₂Cl₂ (150 ml) a vodu (100 ml) a extrahován CH₂Cl₂. Organický extrakt byl promyt nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml) a odpařen do sucha. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH₂Cl₂ → aceton. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 1,35 g (92 %) čistého produktu. ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,16 (d, 6H, IbCH₃), 1,94 (s, 3H, CH₃), 2,52 (m, 1H), 3,20 (bs, 1H), 3,80-4,30 (m, 6H), 4,56 (m, 1H), 7,14 (d, 2H, C₆H a NH), 7,50 (t, 2H, Ph), 7,64 (t, 1H, Ph) a 7,94 (d, 2H, Ph).

1-O-isobutyryl-2-[(β-(4,4'-dimethoxytrityl)-O-acetyl)amino]-3-[N₃-benzoyl(thyminy)]-L-propanol strukturního vzorce (CCXIII):

1-O-isobutyryl-2-[(β-hydroxyacetyl)amino]-3-[N₃-benzoyl(thyminy)]-L-propanol strukturního vzorce (CCXII) (1,2 g, 2,78 mmol) byl rozpuštěn v suchém pyridinu (50 ml) a ponechán míchat za laboratorní teploty pod argonovou atmosférou. K tomuto míchanému roztoku byl přidán TEA (0,35 g, 3,5 mmol) a 4,4'-dimethoxytritylchlorid (1,18 g, 3,5 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 12 hodin, ukončena methanolem (10 ml) a odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (150 ml), promyt 5% roztokem NaHCO₃ (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH₂Cl₂ → ethylacetát. Frakce s čistým

produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 1,7 g (83 %) čistého produktu. ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,16 (d, 6H, 1bCH₃), 1,94 (s, 3H, CH₃), 2,52 (m, 1H), 3,74 (s, 6H, 2.OCH₃), 3,80-4,30 (m, 6H), 4,56 (m, 1H), 6,82 (d, 4H, Ph), 7,14 (d, 2H, C₆H a NH) a 7,26-8,00 (m, 14H, Ph).

- 5 **2-[(β-(4,4'-dimethoxytrityl)-O-acetyl)amino]-3-thyminyll-L-propanol** strukturního vzorce (CCXIV):

1-O-isobutyryl-2-[(β-(4,4'-dimethoxytrityl)-O-acetyl)amino]-3-[N₃-benzoyl(thyminyll)-L-propanol strukturního vzorce (CCXIII) (1,55 g, 2,05 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (20 ml) a ochlazen ledovou lázní na 0 °C. K tomuto studenému míchanému roztoku byl přidán 2 N NaOH (5 ml, 10 mmol) a míchání pokračovalo po dobu 30 minut při 0 °C. Pomocí kyseliny octové bylo pH roztoku upraveno na 7 a pak byl roztok odpařen do sucha. Odparek byl rozdělen mezi vodu (50 ml) a CH₂Cl₂ (250 ml) a extrahován CH₂Cl₂. Vodná vrstva byla opět extrahována CH₂Cl₂ (50 ml). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml) vysušeny a odpařeny do sucha. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH₂Cl₂ → aceton. Výtěžek: 1,0 g (99 %). ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,94 (s, 3H, CH₃), 3,74 (s, 6H, 2.OCH₃), 3,80-4,30 (m, 6H), 4,56 (m, 1H), 6,82 (d, 4H, Ph), 7,14 (d, 2H, C₆H a NH) a 7,26-8,00 (m, 14H, Ph).

2-[(β-(4,4'-dimethoxytrityl)-O-acetyl)amino]-3-thyminyll-L-propan-1-O-(N,N-diisopropyl)-β-kyanoethylfosforamidit strukturního vzorce (CCXV):

20 **2-[(β-(4,4'-dimethoxytrityl)-O-acetyl)amino]-3-thyminyll-L-propanol** strukturního vzorce (CCXIV) (1,00 g, 2,09 mmol) byl vysušen za sníženého tlaku přes noc nad pevným NaOH a rozpuštěn v suchém CH₂Cl₂ (50 ml). Roztok byl ochlazen na 0 °C pod argonovou atmosférou. K tomuto ochlazenému roztoku byl za míchání přidán N,N-diisopropylethylamin (0,54 g, 4,2 mmol) a 2-kyanoethyl-N,N-diisopropylchlorofosforamidit (0,73 g, 3,1 mmol). Reakční směs byla míchána 1 hodinu při 0 °C a pak 2 hodiny při laboratorní teplotě. Reakční směs byla zředěna CH₂Cl₂ (100 ml) a organická vrstva byla promyta 5% roztokem NaHCO₃ (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Extrakt CH₂Cl₂ byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž byl získán olejovitý odparek. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH₂Cl₂ → ethylacetát s
30 přidavkem 0,1% TEA. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž byla získána pěna. Ta byla sušena za sníženého tlaku přes noc nad pevným NaOH. Vysušená pěna byla rozpuštěna v suchém CH₂Cl₂ (10 ml) a během 30 minut pod argonovou atmosférou přikapána do míchaného roztoku suchého hexanu (800 ml). Po přidání CH₂Cl₂ roztoku byla vzniklá sraženina míchána po dobu dalších 30 minut, odfiltrována, promyta suchým hexanem
35 (100 ml) a vysušena po dobu 4 hodin nad pevným NaOH za sníženého tlaku. Výtěžek: 1,3 g (82 %).

Příklad 29

(Viz obrázek 29)

N^α-tert.-butyloxykarbonyl-O-benzylhydroxylamin strukturního vzorce (CCXVI):

40 Hydrochlorid O-benzylhydroxylaminu (15,9 g, 100 mmol) byl suspendován ve směsi THF (150 ml) a vody (50 ml). K této směsi byl za míchání přidán TEA (15,15 g, 150 mmol) a di-tert.-butyldikarbonát (23,98 g, 110 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 12 hodin a odpařena do sucha. Odparek byl rozdělen mezi ethylacetát (250 ml) a vodu (200 ml) a extrahován ethylacetátem. Ethylacetátový extrakt byl promyt hydrogensíranem draselným
45 (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml), vysušen a odpařen do sucha, čímž bylo získáno 15 g (91 %) čirého oleje.

1-chlor-2-(tetrahydropyranyl)oxyethan strukturního vzorce (CCXVII):

1-chlorethanol (8,06 g, 100 mmol) byl rozpuštěn v suchém CH₂Cl₂ (100 ml) a pod argonovou atmosférou ochlazen ledovou lázní na 0 °C. K tomuto roztoku byl za míchání přidán

dihydropyran (12,6 g, 150 mmol) a pyridinium-p-toluen-4-sulfonát (1,25 g, 5 mmol) a míchání pokračovalo přes noc. Reakční směs byla odpařena do sucha a rozpuštěna v ethylacetátu (200 ml). Ethylacetátový extrakt byl promyt 5% roztokem NaHCO_3 (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml). Organický extrakt byl vysušen a odpařen do sucha. Surový materiál byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází hexan $\rightarrow$ CH_2Cl_2 . Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny, čímž bylo získáno 11 g (67 %) čistého produktu.

N-tert.-butyloxykarbonyl-N-[(tetrahydropyranyl)oxy]ethyl-O-benzylhydroxylamin strukturního vzorce (CCXVIII):

K roztoku N-tert.-butyloxykarbonyl-O-benzylhydroxylaminu strukturního vzorce (CCXVI) (5,79 g, 25,96 mmol) v suchém DMF (50 ml) byl pomalu během 15 minut pod argonovou atmosférou při 0 °C přidán NaH (60%, 1,2 g, 30 mmol). Reakce byla ponechána míchat při 0 °C po dobu 30 minut a po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Pak byl přidán 1-chlor-2-(tetrahydropyranyl)oxyethan strukturního vzorce (CCXVII) (4,95 g, 30 mmol) a reakční směs byla ohřáta na 80 °C na dobu 12 hodin. Reakce byla ochlazena a odpařena do sucha. Odparek byl suspendován ve vodě (50 ml), pH roztoku bylo upraveno na 7 a roztok byl extrahován ethylacetátem (150 ml). Ethylacetátový extrakt byl promyt vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušen a odpařen do sucha. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází hexan $\rightarrow$ CH_2Cl_2 . Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny, čímž bylo získáno 6,0 g (66 %) olejovitého produktu. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,48 (s, 9H, Boc), 1,49-1,84 (m, 6H, 3. CH_2), 3,48-3,70 (m, 4H, 2. CH_2), 4,60 (t, 1H, CH), 4,84 (s, 2H, CH_2Ph) a 7,32-7,42 (m, 5H, Ph).

N-tert.-butyloxykarbonyl-N-[(2-hydroxy)ethyl]-O-benzylhydroxylamin strukturního vzorce (CCXIX):

Roztok N-tert.-butyloxykarbonyl-N-[(tetrahydropyranyl)oxy]ethyl-O-benzylhydroxylaminu strukturního vzorce (CCXVIII) (3,51 g, 10 mmol) ve směsi THF : voda : AcOH (1 : 1 : 1, 100 ml) byl za míchání zahříván po dobu 3 hodin na 70 °C. Reakce byla ochlazena na 0 °C a pH pomocí pevného NaHCO_3 upraveno na 7. Reakční směs byla extrahována ethylacetátem (2 $\times$ 75 ml). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml), vysušeny a odpařeny do sucha. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow$ ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny, čímž bylo získáno 2,5 g (94 %) pěny. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,48 (s, 9H, Boc), 3,60 (t, 2H, CH_2), 3,74 (m, 2H, CH_2), 4,84 (s, 2H, CH_2Ph) a 7,32-7,42 (m, 5H, Ph).

N-tert.-butyloxykarbonyl-N-[(2-isobutyryl)oxy]ethyl-O-benzylhydroxylamin strukturního vzorce (CCXX):

K roztoku N-tert.-butyloxykarbonyl-N-[(2-hydroxy)ethyl]-O-benzylhydroxylaminu strukturního vzorce (CCXIX) (4,2 g, 16,6 mmol) v suchém pyridinu (50 ml) byl za laboratorní teploty pod argonovou atmosférou přidán TEA (2,02 g, 20 mmol) a anhydrid kyseliny isobutyrové (3,16 g, 20 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 12 hodin a odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (200 ml), promyt NaHCO_3 (5% roztok, 100 ml), vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen a odpařen do sucha. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH_2Cl_2 . Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny, čímž bylo získáno 4,5 g (80 %) čistého produktu. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,04 (d, 6H, IbCH_3), 1,48 (s, 9H, Boc), 2,44 (m, 1H, IbCH), 3,60 (m, 2H, CH_2), 3,74 (m, 2H, CH_2), 4,84 (s, 2H, CH_2Ph) a 7,32-7,42 (m, 5H, Ph).

N-(thyminylacetyl)-N-[(2-isobutyryl)oxy]ethyl-O-benzylhydroxylamin strukturního vzorce (CCXXI):

N-tert.-butyloxykarbonyl-N-[(2-isobutyryl)oxy]ethyl-O-benzylhydroxylamin strukturního vzorce (CCXX) (5,0 g, 14,84 mmol) byl rozpuštěn v CH_2Cl_2 (10 ml) a ponechán míchat po dobu 30 minut v TFA (12 ml). Reakční směs byla odpařena do sucha a rozpuštěna v suchém

methanolu (10 ml). Vše bylo opět odpařeno do sucha a vysušeno za sníženého tlaku přes noc nad pevným NaOH. Vysušený odparek byl bez charakterizace použit pro další reakci.

Thyminoctová kyselina strukturního vzorce (CXCI) (3,13 g, 17 mmol) byla rozpuštěna v suchém DMF (75 ml) a ochlazená pod argonovou atmosférou na -20 °C. K tomuto vychlazenému
 5 míchánému roztoku byl přidán N-methylmorpholin (2,02 g, 20 mmol) a isobutylchloroformiát (2,72 g, 20 mmol). Po 15 minutách míchání byl roztok TFA soli vyrobené postupem popsáním v předešlém odstavci v suchém DMF (50 ml) neutralizován N-methylmorpholinem (2,02 g, 20 mmol) a ihned najednou přidán do studeného mícháného roztoku thyminoctové kyseliny. Reakční směs byla míchána při teplotě -20 °C po dobu 1 hodiny, ohřáta na laboratorní teplotu a v
 10 míchání bylo pokračováno přes noc. Roztok byl odpařen do sucha a odparek rozpuštěn v CH₂Cl₂ (250 ml) a vodě (100 ml) a extrahován CH₂Cl₂. Organický extrakt byl promyt 5% roztokem NaHCO₃ (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen a odpařen do sucha, čímž byl získán surový produkt. Surový produkt byl
 15 čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH₂Cl₂ → aceton. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 4,0 g (70 %) čistého produktu. Čistý produkt byl krystalizován ze směsi CH₂Cl₂/hexan, čímž byla získána látka o teplotě tání 185 °C až 188 °C. ¹HNMR (Me₂SO-d₆): δ 1,00 (d, 6H, IbCH₃), 1,74 (s, 3H, CH₃), 2,44 (m, 1H, IbCH), 3,92 (m, 2H), 4,18 (t, 2H), 4,68 (bs, 2H), 4,98 (s, 2H), 7,34 (s, 1H, C₆H), 7,40-7,50 (m, 5H, Ph), a 11,32 (bs, 1H, NH).

20 Příklad 30

(Viz obrázek 30)

(2R,4R)-2-karbomethoxy-4-hydroxypyrrolidin strukturního vzorce (CCXXIII):

Do kulaté baňky o obsahu 250 ml vybavené magnetickým míchadlem a zpětným chladičem byl umístěn suchý methanol (40 ml) a ochlazen ledovou lázní pod argonovou atmosférou. Za míchání
 25 byl přidán acetylchlorid (4,32 g, 55 mmol) a cis-4-hydroxy-D-prolin strukturního vzorce (CCXXII) (5,00 g, 38,17 mmol). Vzniklý roztok byl zahříván k varu pod zpětným chladičem po dobu 7 až 8 hodin a ochlazen na laboratorní teplotu. Roztok byl zředěn etherem a vzniklá bílá látka byla odsáta, promyta etherem a vysušena za sníženého tlaku nad pevným NaOH. Výtěžek: 6,9 g (100 %). ¹HNMR (CDCl₃): δ 2,09 (2, dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,49-3,73 (m, 3H), 3,79 (s, 3H, CH₃), 4,34 (m, 2H).

(2R,4R)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-karbomethoxy-4-hydroxypyrrolidin strukturního vzorce (CCXXIV):

K roztoku (2R,4R)-2-karbomethoxy-4-hydroxypyrrolidinu strukturního vzorce (CCXXIII) (6,9 g, 38,12 mmol) ve směsi THF/voda (8 : 2, 150 ml) byl přidán za laboratorní teploty TEA
 35 (10,1 g, 100 mmol) a di-tert.-butyldikarbonát (10,9 g, 50 mmol). Reakční směs byla míchána 6 hodin za laboratorní teploty a odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (200 ml) a promyt 0,5 N roztokem hydrogensíranu draselného (50 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml). Organický extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha, čímž bylo získáno 7,8 g (84 %) olejovitého odparku. Olejovitý produkt poskytl
 40 po sušení bezbarvou pevnou látku o teplotě tání 75 °C až 77 °C. ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,45 (s, 9H, Boc), 2,09 (2 dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,49-3,73 (m, 3H), 3,79 (s, 3H, CH₃), 4,34 (m, 2H).

(2R,4R)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-hydroxymethyl-4-hydroxypyrrolidin strukturního vzorce (CCXXV):

K roztoku (2R,4R)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-karbomethoxy-4-hydroxypyrrolidinu strukturního vzorce (CCXXIV) (7,0 g, 28,6 mmol) byl rozpuštěn v suchém THF (100 ml) a ochlazen
 45 pod argonovou atmosférou lázní led/sůl. K tomuto ochlazenému roztoku byl přidán po malých částech během 15 minut tetrahydridoboritan litný (1,88 g, 85,8 mmol). Po skončení přidávání byla reakční směs míchána při 0 °C po dobu 1 hodiny a pak 15 hodin za laboratorní teploty pod argonovou atmosférou. Roztok byl ochlazen na 0 °C a zředěn vodou (50 ml) a pH bylo pomocí

AcOH upraveno na 6. Reakce byla odpařena do sucha a rozpuštěna v ethylacetátu (200 ml), promyta vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml). Ethylacetátový extrakt byl vysušen a odpařen do sucha. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow$ ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 5,00 g (81 %) čirého oleje. Stáním z oleje vznikla bezbarvá pevná látka o teplotě tání 95 °C až 97 °C. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,45 (s, 9H, Boc), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,40-3,62 (m, 3H), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H), 4,44 (m, 1H).

(2R,4R)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-(4,4'-dimethoxytrityl)-oxymethyl-4-hydroxypyrrolidin strukturního vzorce (CCXXVI):

(2R,4R)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-hydroxymethyl-4-hydroxypyrrolidin strukturního vzorce (CCXXV) (4,4 g, 20, 28 mmol) byl rozpuštěn v suchém pyridinu (50 ml) a ponechán míchat pod argonovou atmosférou. K tomuto míchanému roztoku byl přidán TEA (2,53 g, 25 mmol) a 4,4'-dimethoxytritylchlorid (7,45 g, 22 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 12 hodin a pak byla reakce ukončena methanolem (10 ml). Roztok byl odpařen do sucha a rozpuštěn v ethylacetátu (200 ml). Ethylacetátový roztok byl promyt 5% roztokem NaHCO_3 (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného. Organický extrakt byl vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen do sucha. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází hexan $\rightarrow$ ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 8,09 g (100 %) oranžové pěny. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,45 (s, 9H, Boc), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,40-3,62 (m, 3H), 3,74 (s, 6H, 2.OCH₃), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H), 4,44 (m, 1H), 6,82 (d, 4H, Ph) a 7,26-8,00 (m, 9H, Ph).

(2R,4R)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-(4,4'-dimethoxytrityl)oxymethyl-4-[(9-toluensulfonyl)oxy]hydroxypyrrolidin strukturního vzorce (CCXXVII):

(2R,4R)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-(4,4'-dimethoxytrityl)oxymethyl-4-hydroxypyrrolidin strukturního vzorce (CCXXVI) (8,09 g, 20,27 mmol) byl rozpuštěn ve směsi suchého pyridinu a CH_2Cl_2 (2 : 1, 200 ml) a ochlazen pod argonovou atmosférou ledovou lázní. K tomuto ochlazenému roztoku byl přidán TEA (3,03 g, 30 mmol) a p-toluensulfonylchlorid (5,7 g, 30 mmol). Reakční směs byla ponechána míchat při 0 °C po dobu 3 hodin a po dobu 8 h při teplotě nižší než je 30 °C. Reakční směs byla odpařena do sucha, rozdělena mezi ethylacetát (200 ml) a 5% roztok NaHCO_3 (100 ml) a extrahována ethylacetátem. Ethylacetátový extrakt byl promyt vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml), vysušen a odpařen do sucha. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází hexan $\rightarrow$ ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 12,2 g (89 %) oranžového oleje. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,45 (s, 9H, Boc), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 2,40 (s, 3H, CH₃), 3,40-3,62 (m, 3H), 3,74 (s, 6H, 2.OCH₃), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H), 4,44 (m, 1H), 6,82 (d, 4H, Ph) a 7,26-8,00 (m, 13H, Ph).

(2R,4S)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-(4,4'-dimethoxytrityl)oxymethyl-4-azido-pyrrolidin strukturního vzorce (CCXXVIII):

(2R,4R)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-(4,4'-dimethoxytrityl)oxymethyl-4-[(9-toluensulfonyl)-oxy]hydroxypyrrolidin strukturního vzorce (CCXXVII) (5,1 g, 7,58 mmol) byl rozpuštěn v dimethylformamidu (50 ml) a zředěn vodou (5 ml). K tomuto míchanému roztoku byl přidán azid sodný (0,65 g, 10 mmol) a vše bylo zahříváno po dobu 8 hodin na 80 °C. Reakční směs byla ochlazená a odpařena do sucha. Odparek byl rozdělen mezi CH_2Cl_2 (200 ml) a vodu (100 ml) a extrahován CH_2Cl_2 . Organický extrakt byl promyt nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml), vysušen Na_2SO_4 a odpařen do sucha. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází hexan $\rightarrow$ ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 3,8 g (92 %) čirého oleje. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1,45 (s, 9H, Boc), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,40-3,62 (m, 3H), 3,74 (s, 6H, 2.OCH₃), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H), 4,44 (m, 1H), 6,82 (d, 4H, Ph) a 7,26-8,00 (m, 9H, Ph).

(2R,4S)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-hydroxymethyl-4-aminopyrrolidin strukturního vzorce (CCXXIX):

(2R,4S)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-(4,4'-dimethoxytrityl)oxymethyl-4-azidopyrrolidin strukturního vzorce (CCXXVIII) (2,72 g, 5 mmol) v methanolu (75 ml) byl hydrogenován v přítomnosti 10% palladia na uhlí (0,3 g) za laboratorní teploty při tlaku 506,6 kPa. Po 12 hodinách byl katalyzátor odfiltrován, promyt methanolem (20 ml) a rozpouštědlo bylo odpařeno
 5 za sníženého tlaku. Výtěžek 1,0 g (93 %). ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,45 (s, 9H, Boc), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,40-3,62 (m, 3H), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H) a 4,44 (m, 1H).

(2R,4S)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-hydroxymethyl-4-ftalimidopyrrolidin
 strukturního vzorce (CCXXX):

(2R,4S)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-hydroxymethyl-4-aminopyrrolidin strukturního vzorce
 10 (CCXXIX) (1,00 g, 4,63 mmol) byl rozpuštěn v suchém methanolu (20 ml) a ponechán reagovat s N-ethoxykarbonylftalimidem (1,09 g, 5 mmol) za laboratorní teploty. Reakční směs byla míchána po dobu 6 hodin a odpařena do sucha. Odparek byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází CH₂Cl₂ → ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha, čímž bylo získáno 1,5 g (94 %) čisté sloučeniny ve formě pěny.
 15 ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,45 (s, 9H, Boc), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,40-3,62 (m, 3H), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H), 4,44 (m, 1H) a 7,3-7,6 (m, 4H, Ph).

(2R,4S)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-[N₃-benzoyl(thymin-1-yl)]methyl-4-ftalimidopyrrolidin strukturního vzorce (CCXXXI):

K roztoku N₃-benzoylthyminu strukturního vzorce (CCVIII) (1,15 g, 5 mmol) v suchém THF
 20 (70 ml) pod argonovou atmosférou byl za míchání přidán za laboratorní teploty trifenyfosfin (2,62 g, 10 mmol) a (2R,4S)-1-(tert.-butyloxykarbonyl)-2-hydroxymethyl-4-ftalimidopyrrolidin (1,4 g, 4,05 mmol). Po 15 minutách byl pomalu během 10 minut přidán diethylazodikarboxylát (1,74 g, 10 mmol). Reakční směs byla zakryta alobalem a ponechána míchat za laboratorní teploty pod argonovou atmosférou po dobu 24 hodin. Rozpouštědlo bylo
 25 odpařeno a odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (150 ml). Organický extrakt byl promyt 5% roztokem NaHCO₃ (100 ml), vodou (100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (100 ml) a vysušen bezvodým Na₂SO₄. Vysušený ethylacetátový extrakt byl odpařen do sucha, čímž byl získán oranžový olej. Surový produkt byl čištěn "flash" kolonovou chromatografií na silikagelu mobilní fází hexan → ethylacetát. Frakce s čistým produktem byly spojeny a odpařeny do sucha,
 30 čímž byl získán světle růžový olej. Výtěžek: 2,0 g (89 %). ¹HNMR (CDCl₃): δ 1,41 (s, 9H, Boc), 1,72 (s, 3H, CH₃), 1,90 (dd, 1H), 2,34 (m, 1H), 3,40-3,62 (m, 3H), 4,00 (m, 2H), 4,28 (bs, 1H), 4,44 (m, 1H), 7,06 (s, 1H, C₆H) a 7,20-7,60 (m, 9H, Ph).

Příklad 31

Syntéza oligonukleotidů: Oligonukleotidy obsahující modifikované aminokyselinové základní
 35 řetězce byly syntetizovány na automatickém DNA syntetizátoru (Applied Biosystems model 394) použitím standardní fosforamiditové metody. β-kyanoethylfosforamidit, syntetická činidla a CPG polystyrenové kolony byly koupeny od Applied Biosystems (Foster City, CA). Pro fosforothioátové oligonukleotidy byla standardní oxidační láhev nahrazena tetraethylthiuram / acetonitril a pro postupnou thiaci fosfátových spojek byl použit standardní ABI fosforothioátový
 40 program. Po odštěpení z CPG kolony byly odstraněny chránicí skupiny tak, že se oligonukleotidy nechaly reagovat při 55 °C po dobu 8 hodin s koncentrovaným hydroxidem amonným. Oligonukleotidy (dimethoxytritylované) byly čištěny HPLC na reversní fázi na semipreparační C₈ koloně (ABI) mobilní fází lineárním gradientem 5% acetonitril v 0,1 M triethylamonium acetát (pufr A) a acetonitril (pufr B). DMT chránicí skupina byla odstraněna působením 80%
 45 kyseliny octové a produkt byl vysrážen ethanolem. Čistota produktu byla kontrolována HPLC na C₁₈ koloně (Beckman). Aminokyselinové monomery nukleové kyseliny byly zabudovány na 3'-konci, 5'-konci a uprostřed DNA sekvence se 100% účinností připojení. Také byl bez problémů připraven homopolymer o 16 aminokyselinách.

Příklad 32

Analýza hybridizace: Schopnost aminokyselinových modifikovaných oligonukleotidů podle předkládaného technického řešení hybridizovat komplementární RNA a DNA sekvence byla stanovena analýzou tepelného tání. RNA komplement byl syntetizován firmou Genset corporation (La Jolla, CA) a čištěn denaturací močovinou PAGE (urea PAGE). Přirozené antisense oligonukleotidy nebo oligonukleotidy, které obsahují substituci na konkrétních místech byly přidány k RNA nebo DNA komplementu ve stechiometrických koncentracích, aby vznikly dvojšroubovice. Pomocí UV-Vis spektrofotometru Varian Cary 1E byla sledována závislost absorbance (260 nm) hyperchromicity na teplotě při přechodu z dvojšroubovice na náhodné klubko (random coil). Měření byla prováděna v pufru 10 mM Na-fosfát, pH 7,4, 0,1 mM EDTA a NaCl v takovém množství, aby byla získána iontová síla buď 0,1 M nebo 1,0 M. Data byla analyzována grafickou reprezentací $1/T_m$ proti $\ln[Ct]$, kde $[Ct]$ je celková koncentrace oligonukleotidu. Z této analýzy byly stanoveny termodynamické parametry. Na základě získaných informací, které se týkají stability vzniklé dvojšroubovice nebo hetero-dvojšroubovice, bylo stanoveno jaký vliv má zavedení modifikovaného pyrimidinu do oligonukleotidu na stabilitu helikální struktury. Modifikace, které významně změní stabilitu hybridu, vykazují snížení nebo zlepšení volné energie (ΔG) a pak je rozhodnuto o jejich použitelnosti jako antisense oligonukleotidů.

Hybridizační studie byly provedeny s oligonukleotidy, které obsahovaly aminokyselinový základní řetězec na 3'- konci stejně jako na 5'- konci. Předběžné studie prokázaly, že modifikované oligonukleotidy tvoří dvojšroubovici s komplementárními RNA a DNA sekvencemi jako nemodifikované oligonukleotidy.

Příklad 33

Odolnost proti nukleasám: Přirozené, fosforothioátové a modifikované oligonukleotidy podle předkládaného technického řešení byly testovány na odolnost proti sérovým nukleasám tak, že byly inkubovány v médiu, které obsahovalo různé koncentrace séra telecí embryo nebo séra dospělého člověka. Značené oligonukleotidy byly inkubovány po různou dobu ponechány reagovat s proteasou K a pak analyzovány gelovou elektroforézou na 20% polyakrylamid-močovina denaturujícím gelu a následně autoradiografií nebo stanovením fosforu. Autoradiogramy byly zjišťovány laserovou densitometrií. Na základě umístění modifikací a známé délce oligonukleotidu je možné stanovit vliv konkrétní modifikace na odbourávání nukleasami. Pro cytoplasmatické nukleasy byly použity buňky HL60. Post-mitochondriální supernatant byl připraven centrifugací a označené oligonukleotidy byly v tomto supernatantu inkubovány po různou dobu. Po inkubaci bylo stanoveno odbourávání postupem popsaným u odbourávání sérovými nukleasami. Výsledky autoradiografie bylo provedeno srovnání nemodifikovaných tj. fosforothioátových a modifikovaných oligonukleotidů.

Předběžné studie na aminokyselinových modifikovaných oligonukleotidech prokázaly jejich odolnost proti Snake Venom Fosfodiesterase.

Reference:

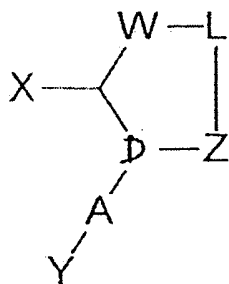
Všechny citované patenty, patentové přihlášky a publikace jsou zde uvedeny jako reference.

Ekvivalenty:

Uvedený popis je pokládán za dostatečný pro to, aby odborník mohl provést technické řešení. Také jsou možné různé modifikace popsaného provedení technického řešení, které jsou zřejmé pro odborníka v oblasti molekulární biologie, organické chemie nebo oblastí spadajících do rozsahu následujících nároků.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Nukleosid s modifikovaným cukrem obecného vzorce I, který patří do kterékoliv ze skupin 1 až 5



(I)

skupina 1, kde

- X je CHR_2OH , kde R_2 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 Y je $\text{Base}-(\text{CH}_2)_n-$, kde Base je nehalogenovaná různá nukleosidová báze, n je 1 až 7;
 A je karbonyl;
 Z je H nebo OR_3 , kde R_3 je H, C_{1-7} alkyl, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 W je CHR_4OH , kde R_4 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 D je dusík; a
 L chybí;

skupina 2, kde

- X je $\text{Base}-(\text{CH}_2)_n-$, kde Base je nehalogenovaná různá nukleosidová báze, n je 1 až 7;
 Y je CHR_2OH , kde R_2 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 A je karbonyl nebo CH_2 ;
 Z je H nebo OR_3 , kde R_3 je H, C_{1-7} alkyl, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 W je CHR_4OH , kde R_4 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 D je dusík; a
 L chybí;

skupina 3, kde

- X je CHR_2OH , kde R_2 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 Y je $\text{Base}-(\text{CH}_2)_n-$, kde Base je nehalogenovaná různá nukleosidová báze, n je 1 až 7;
 A je CH_2 ;
 Z je OH nebo OR_3 , kde R_3 je H, C_{1-7} alkyl, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 W je CHR_4OH , kde R_4 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 D je dusík; a
 L chybí;

skupina 4, kde

- X je $\text{Base}-(\text{CH}_2)_n-$, kde Base je nehalogenovaná různá nukleosidová báze, n je 1 až 7;
 Y je COOH nebo CHR_2OH , kde R_2 je H, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;
 A je karbonyl nebo CH_2 ;
 Z je CH_2 ;
 W je CH_2 ;
 D je dusík; a
 L je CHNHR_5 , kde R_5 je H, OH, OR_3 a R_3 je H, C_{1-7} alkyl, C_{1-7} alkylamino nebo C_{1-7} alkylimidazolyl;

skupina 5, kde

X je CH_2OH , CH_2NH_2 , CONH_2 nebo COOH ;

Y chybí;

Z je CH_2 nebo $\text{CHO-L}_1\text{-B}$;

5 W je O, S nebo CH_2 ;

D je CH ; a

A je COOH , NH_2 , nebo $\text{L}_1\text{-NH-L}_2\text{-B}$, kde B je H nebo nukleosidová báze, a L_1 a L_2 jsou nezávisle $(\text{CH}_2)_n$ nebo $(\text{CH}_2)_n\text{CO}$, kde n je 0, 1, 2 nebo 3, a

10 L je CHCOOH , CHCH_2COOH , CHNH_2 nebo $\text{CH-L}_1\text{-NH-L}_2\text{-B}$, kde B je H nebo nukleosidová báze a L_1 a L_2 jsou nezávisle $(\text{CH}_2)_n$ nebo $(\text{CH}_2)_n\text{CO}$, kde n je 0, 1, 2 nebo 3.

2. Oligonukleotid na bázi monomerních jednotek nukleosidu s modifikovaným cukrem obecného vzorce I podle nároku 1, zpolymerovaných do oligonukleotidu obsahujícího alespoň dvě monomerní jednotky nukleosidu tak, že mezinukleotidové spojky jsou mezi W a X ve skupině 1, W a Y ve skupině 2, W a Z ve skupině 3, L a Y ve skupině 4 a L a A ve skupině 5.

3. Oligonukleotid podle nároku 2, ve kterém je mezinukleotidová spojka fosfordiester.

4. Oligonukleotid podle nároku 2, ve kterém je mezinukleotidová spojka fosforothioát.

5. Oligonukleotid podle nároku 2, ve kterém je mezinukleotidová spojka fosforoamidát.

6. Oligonukleotid podle nároku 2, ve kterém je mezinukleotidová spojka hydroxamát.

20 7. Oligonukleotid podle nároku 2, rozlišitelný na množství monomerních jednotek nukleosidů, kde alespoň jedna z monomerních jednotek nukleosidů zahrnuje 2'-deoxyribosový nukleosid a dále zahrnuje alespoň dvě rozdílné mezinukleotidové spojky vybrané ze skupiny obsahující fosfordiester, fosforothioát, fosforoamidát a hydroxamát.

25 8. Oligonukleotid podle nároku 7, který obsahuje 2'-deoxyribosový nukleosidový penta-furanosylový cyklus, ve kterém je kyslíkový atom cyklu nahrazen jedním substituentem ze skupiny S, CH_2 nebo NR_6 , kde R_6 je acetyl, C_{1-7} alkyl, formyl, karbonyl C_{1-7} alkylamino nebo karbonyl C_{1-7} alkylimidazolyl.

30 9. Oligonukleotid podle nároku 2, ve kterém přinejmenším jedna monomerní jednotka nukleosidu je ze skupiny 5 nároku 1, a maximálně 50 monomerních jednotek nukleosidu je vybráno z 2'-deoxyribonukleosidu, ribonukleosidu a 2'-methylribonukleosidu.

33 výkresů

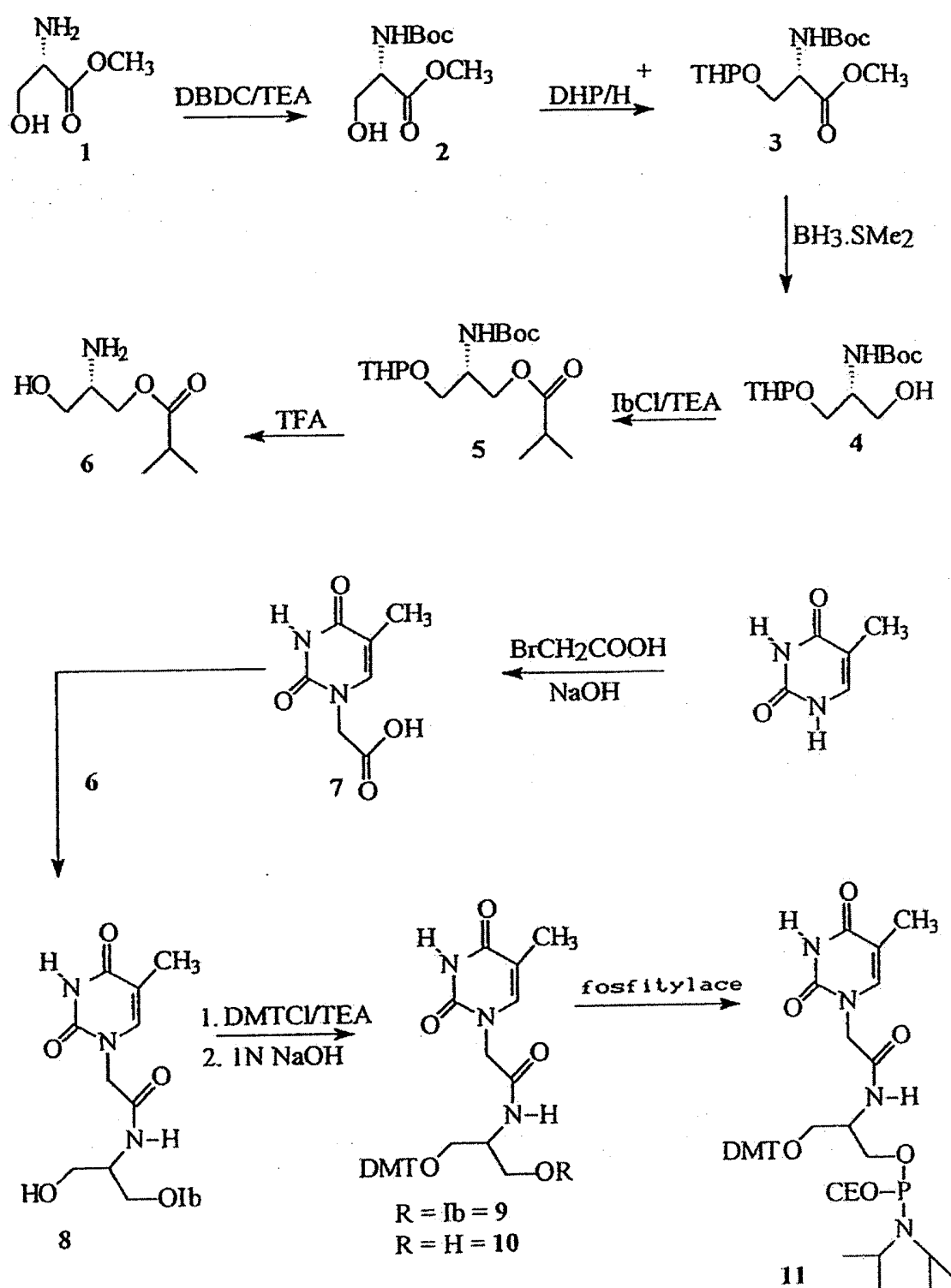


Fig. 1

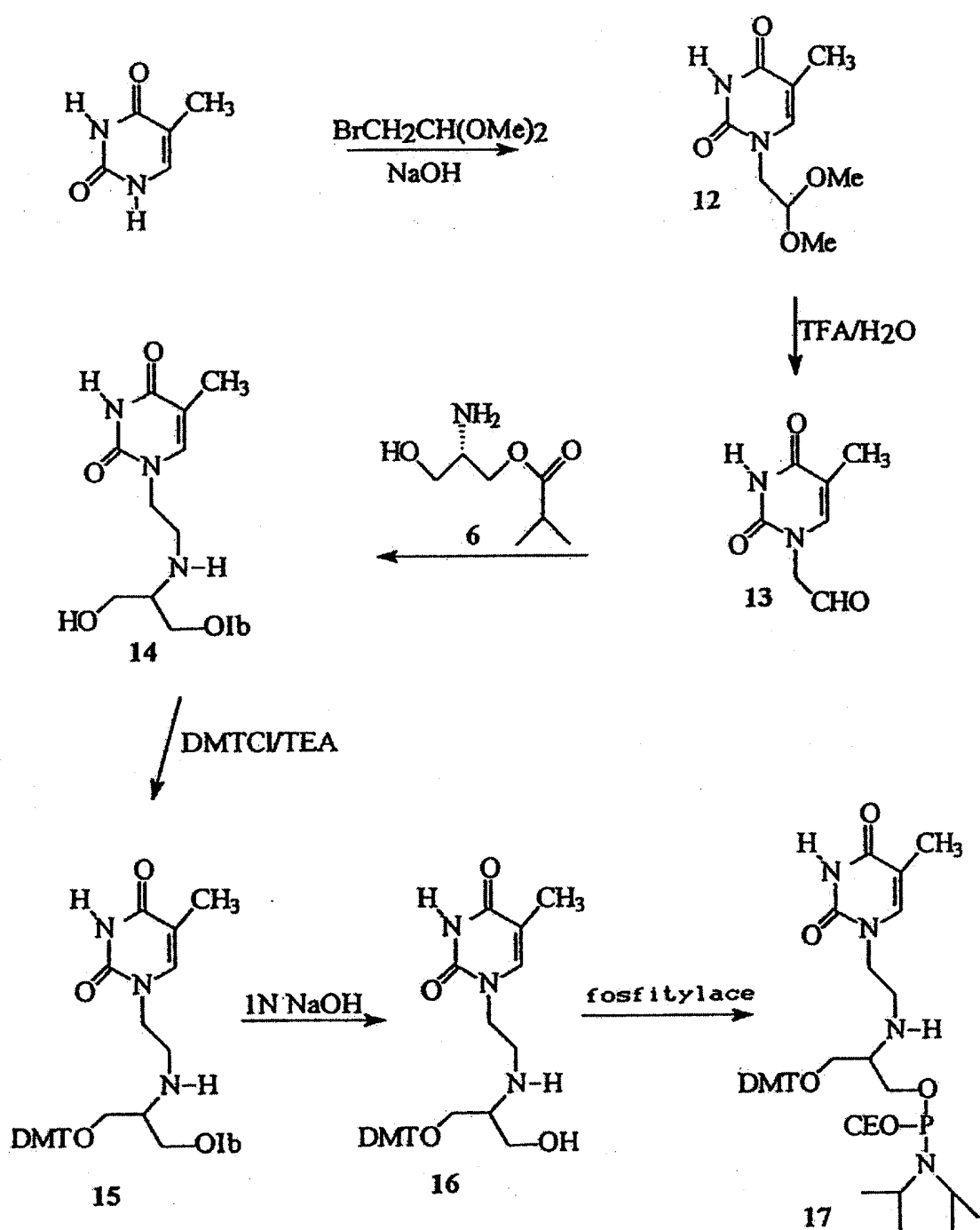


Fig. 2

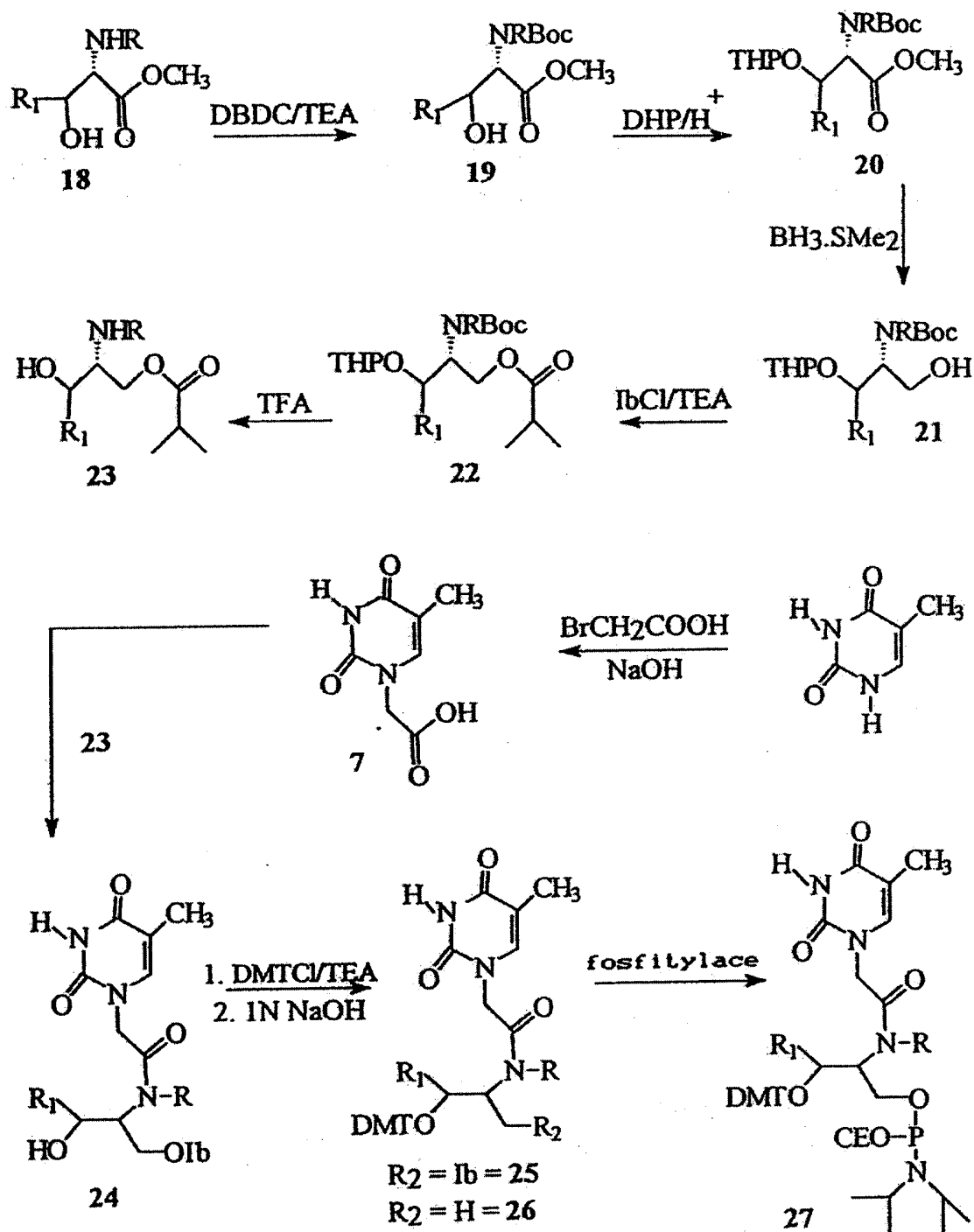


Fig. 3

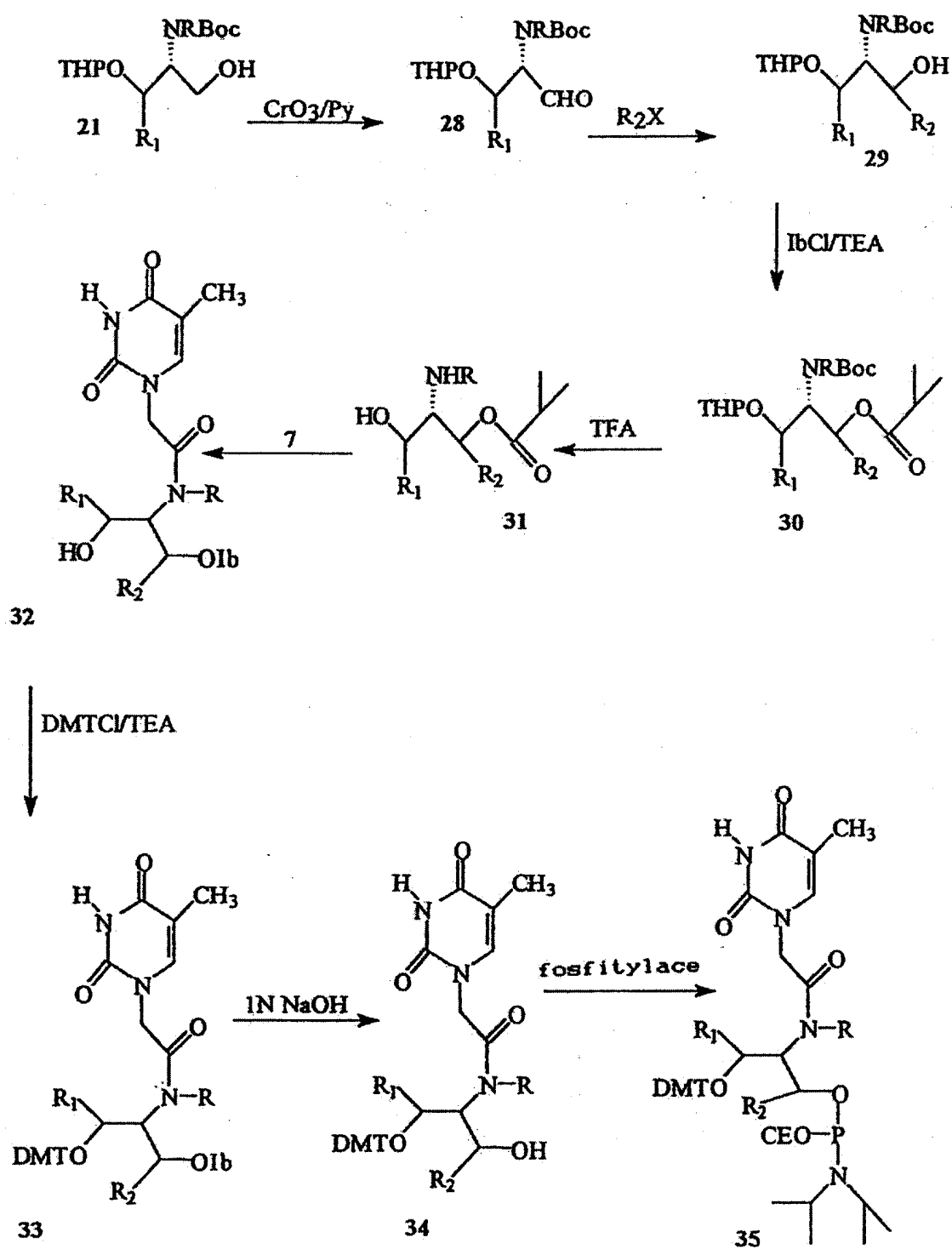


Fig. 4

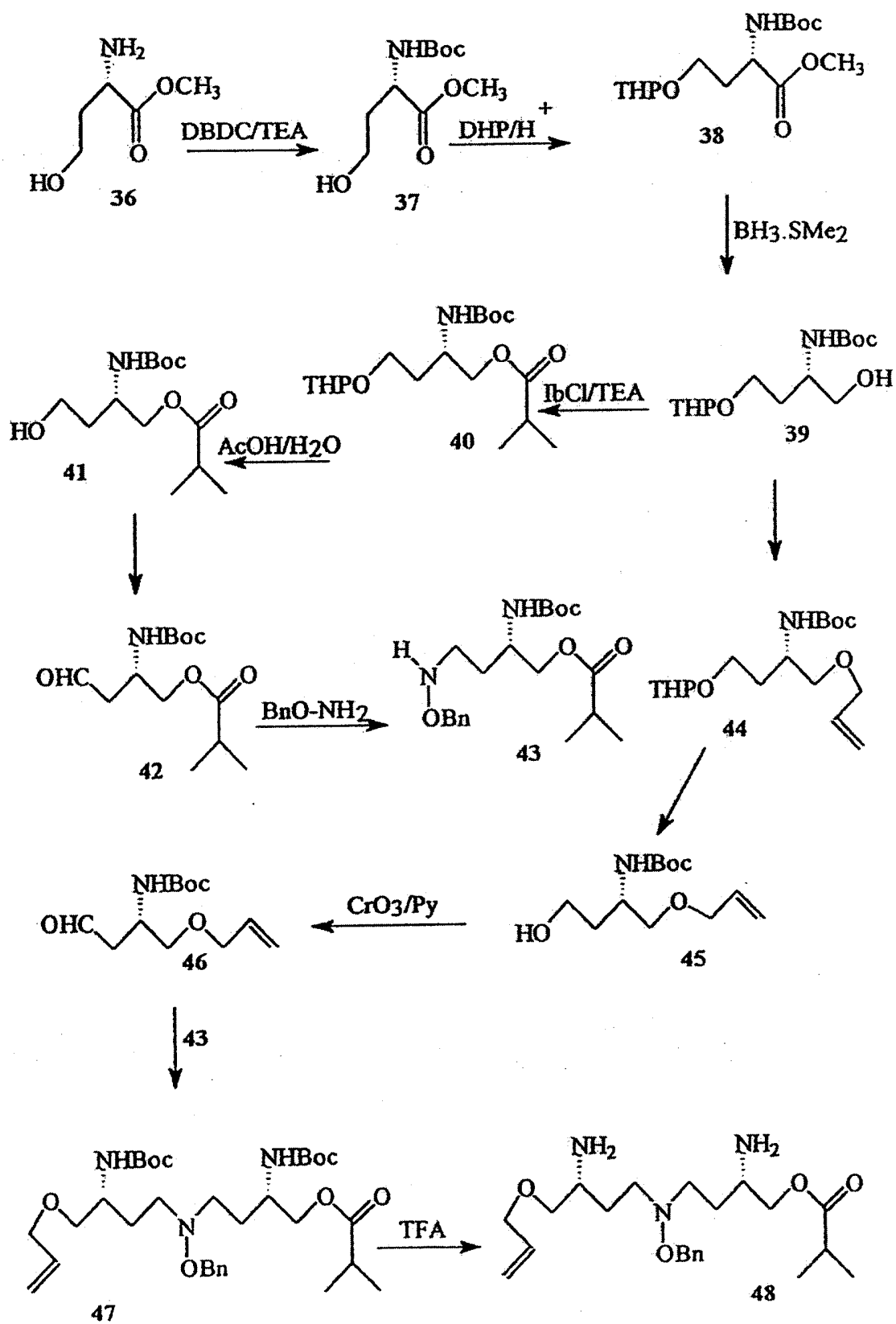


Fig. 5 (pokračování na příští straně)

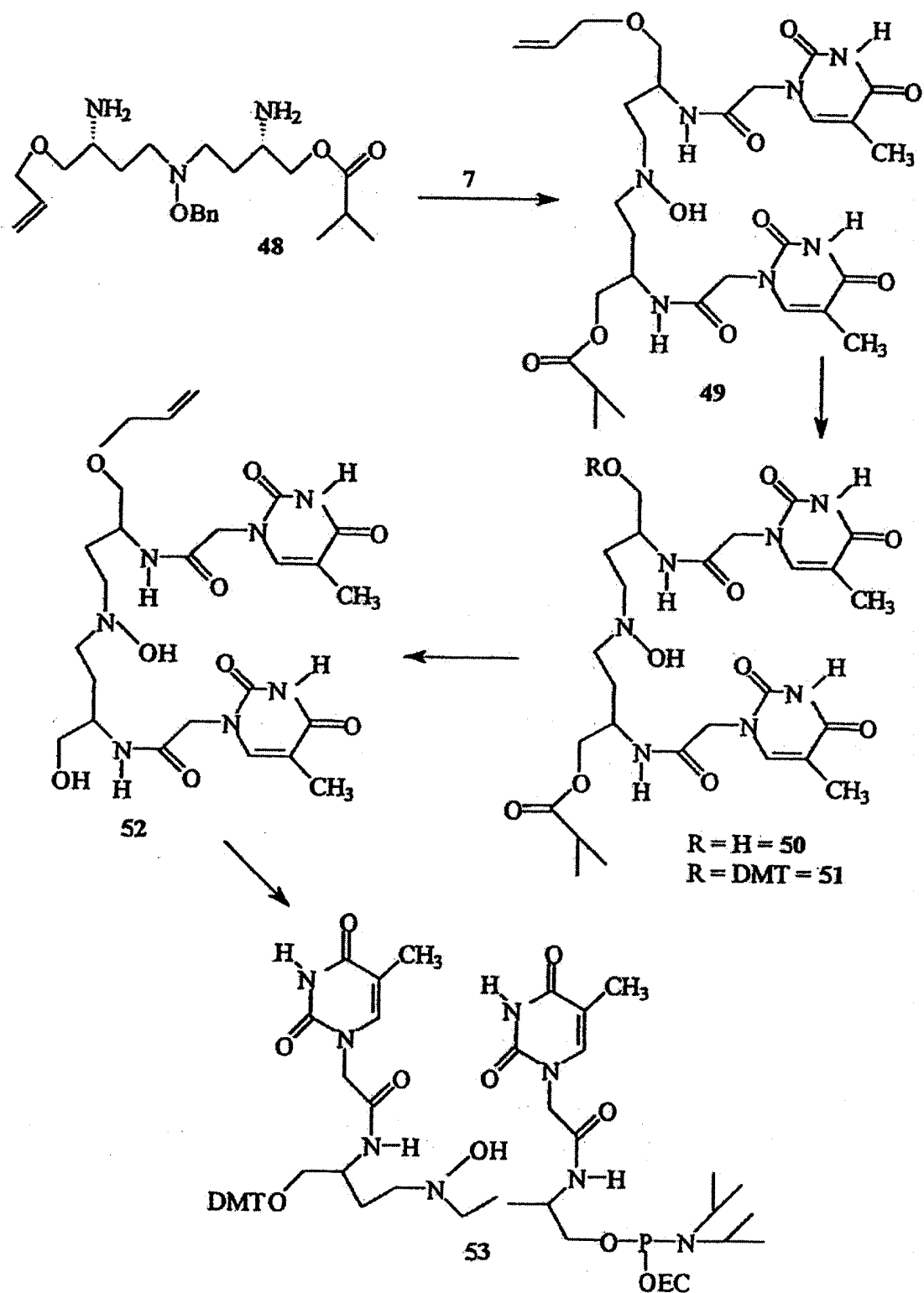


Fig. 5 (pokračování z předešlé strany)

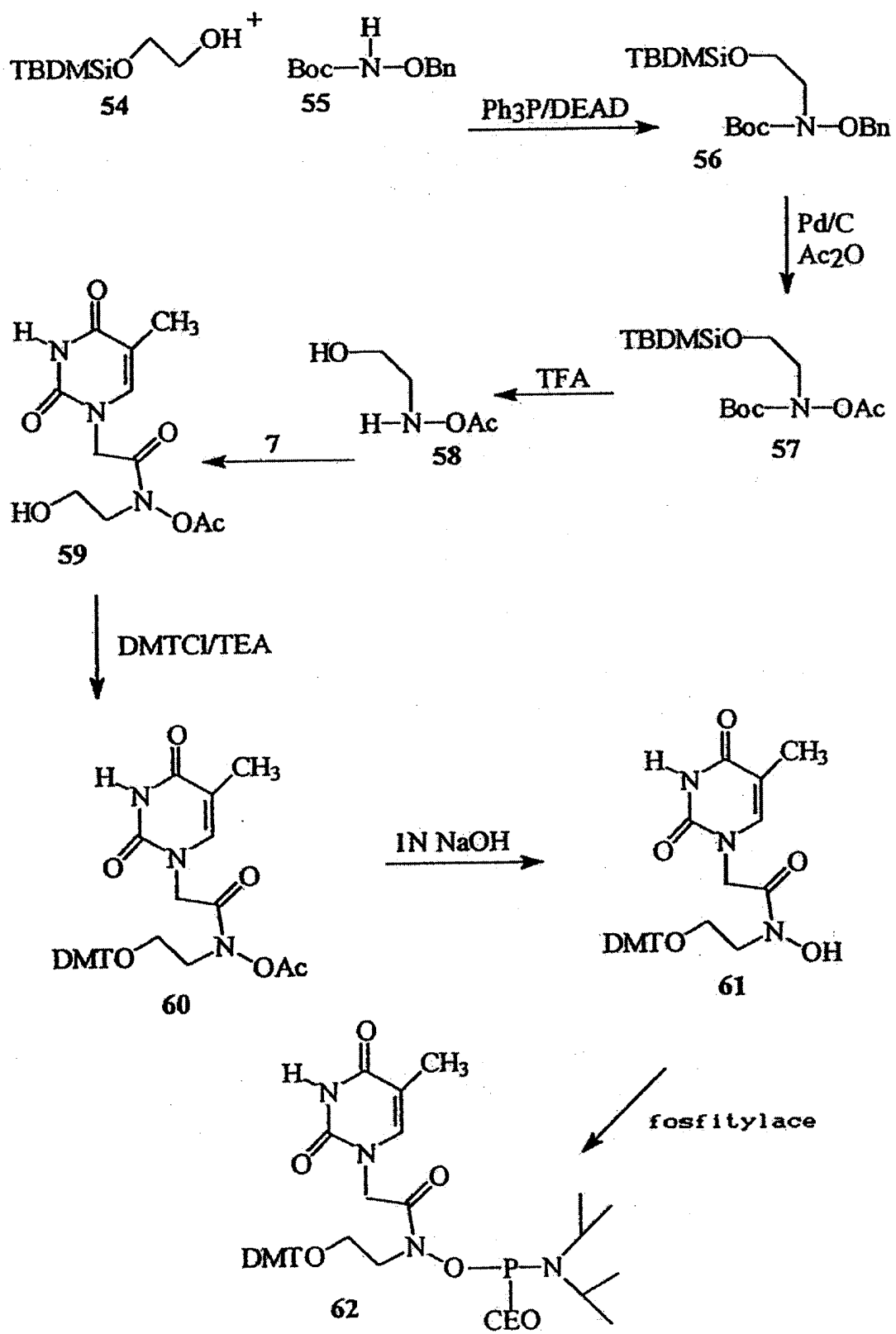


Fig. 6

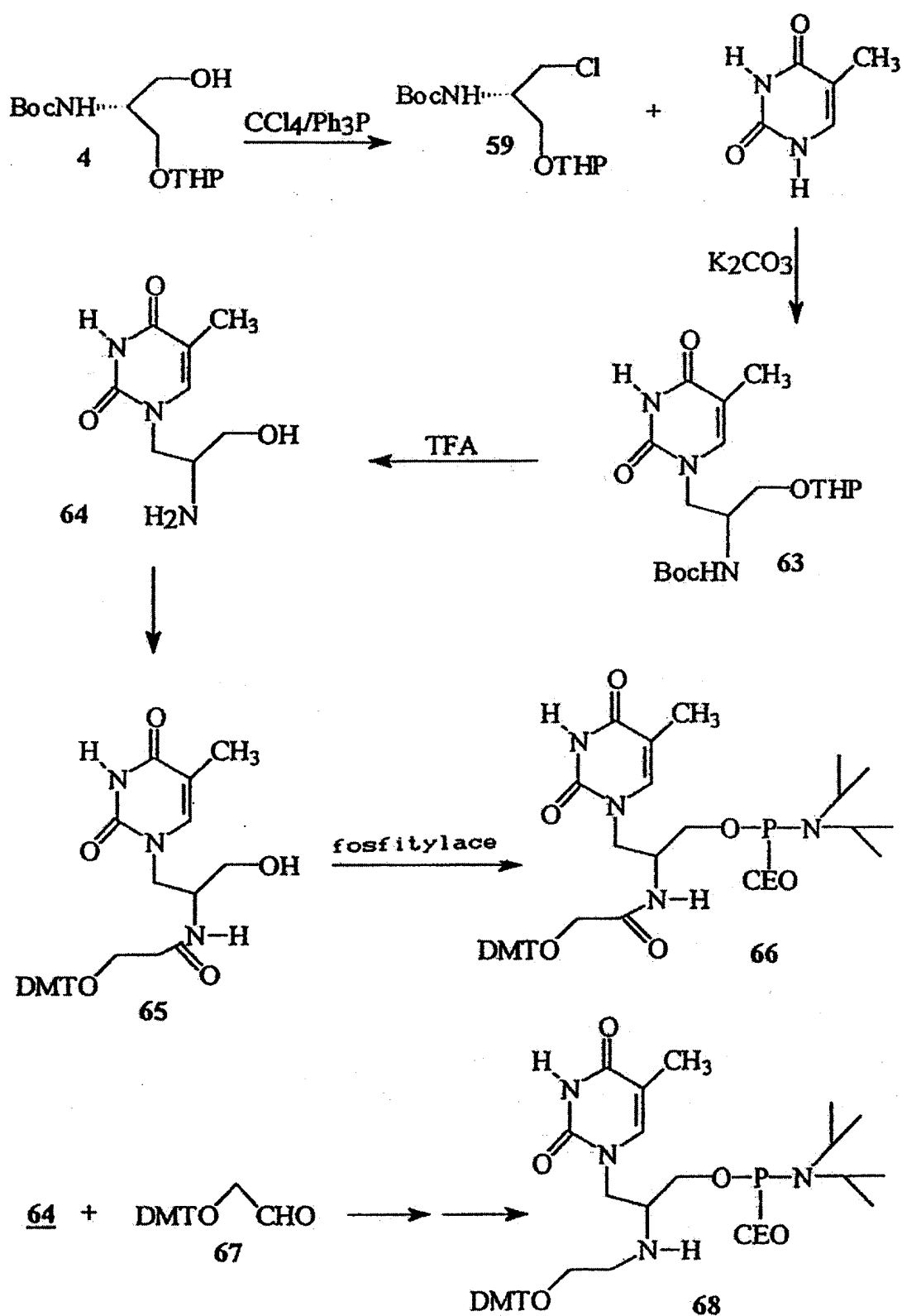


Fig. 7

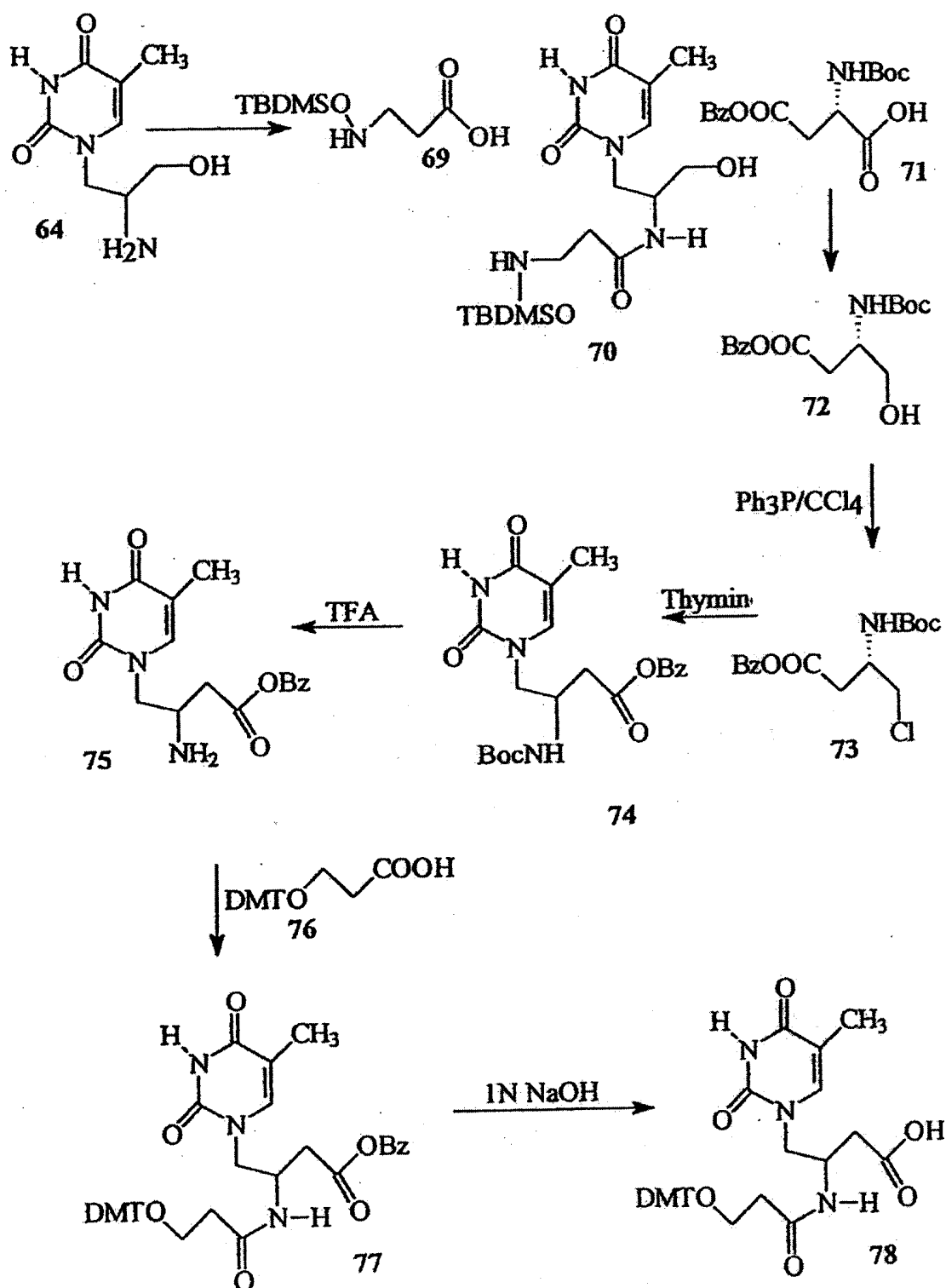


Fig. 8 (pokračování na příští straně)

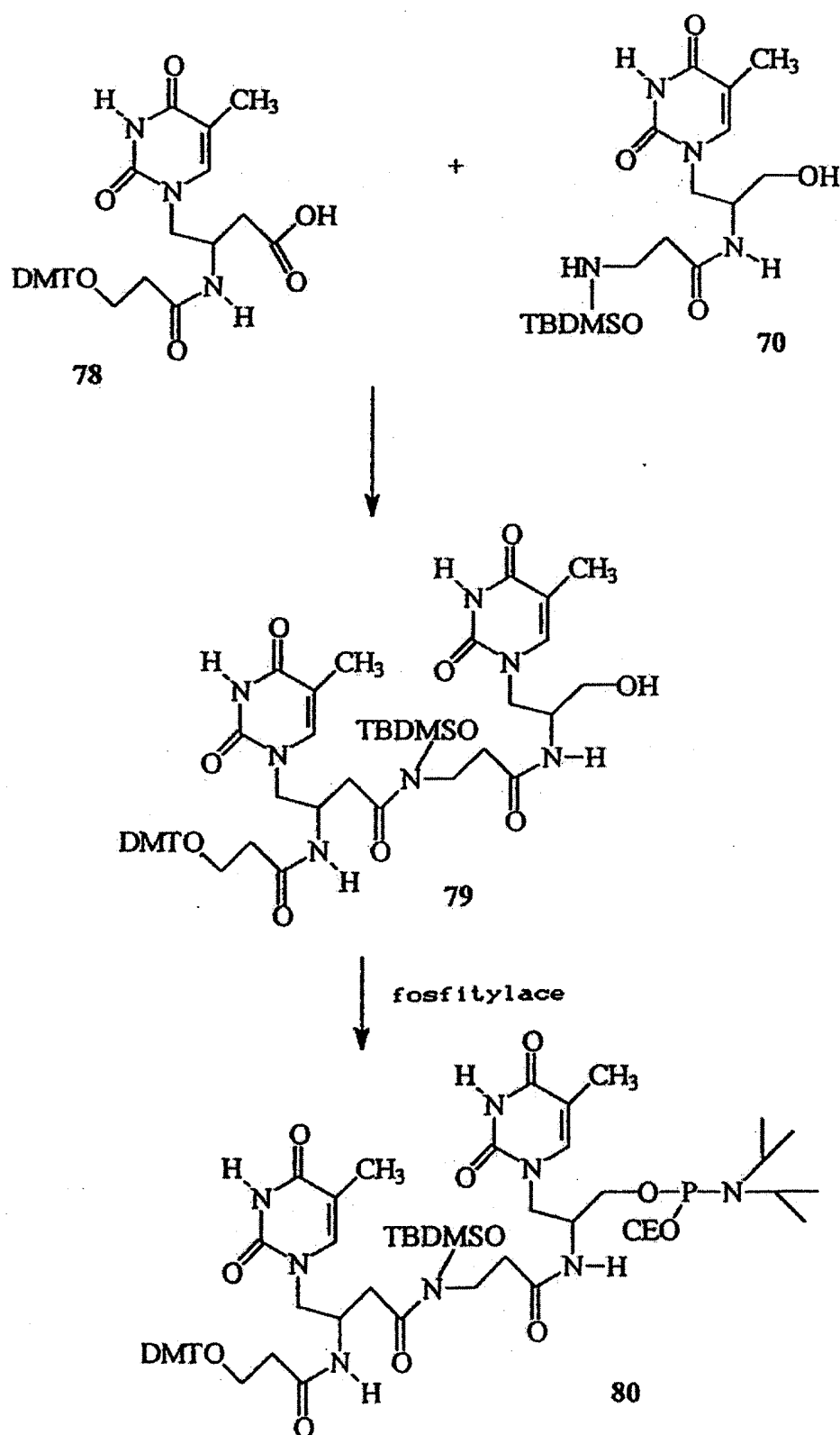


Fig. 8 (pokračování z předešlé strany)

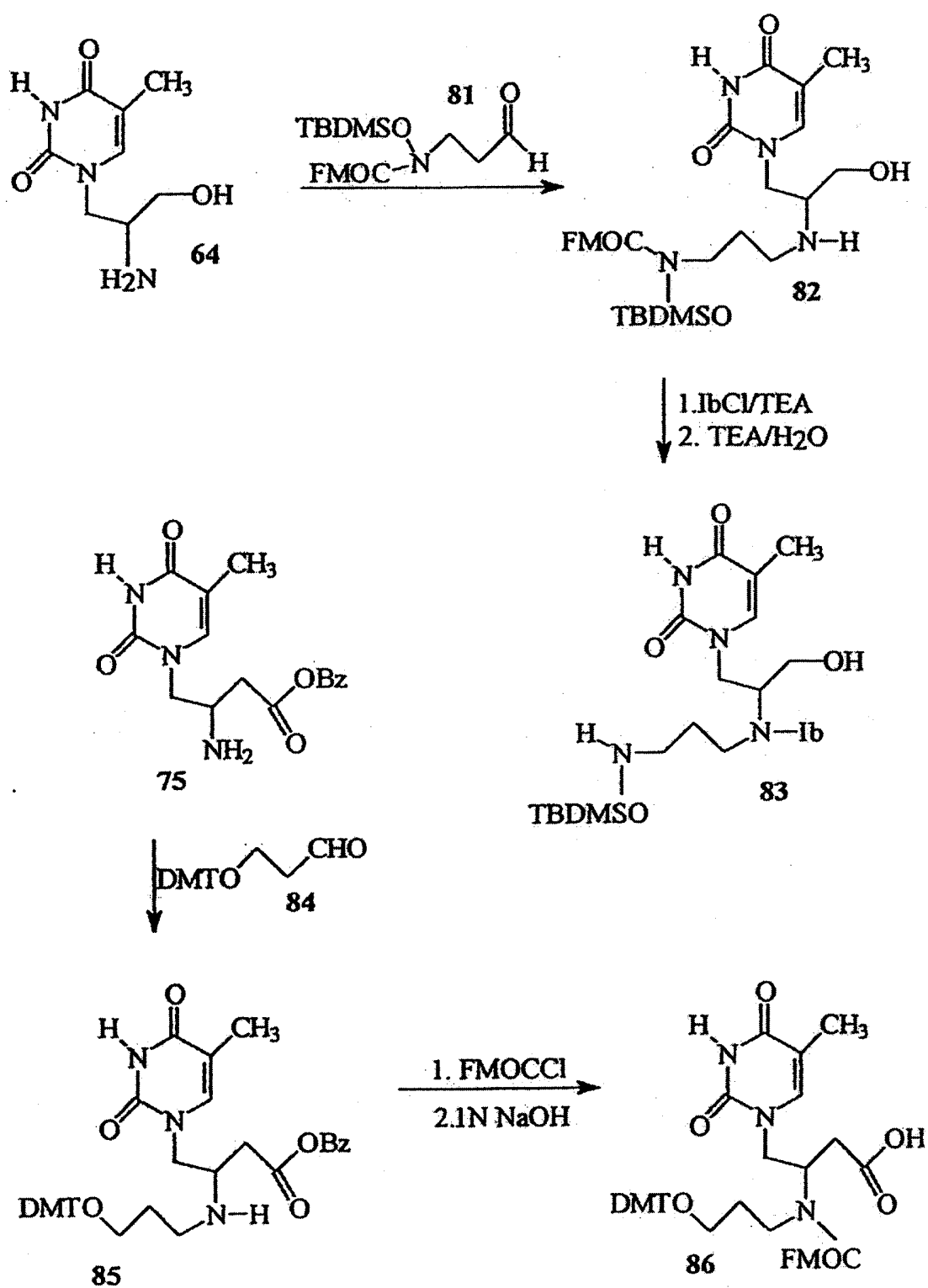


Fig. 9 (pokračování na příští straně)

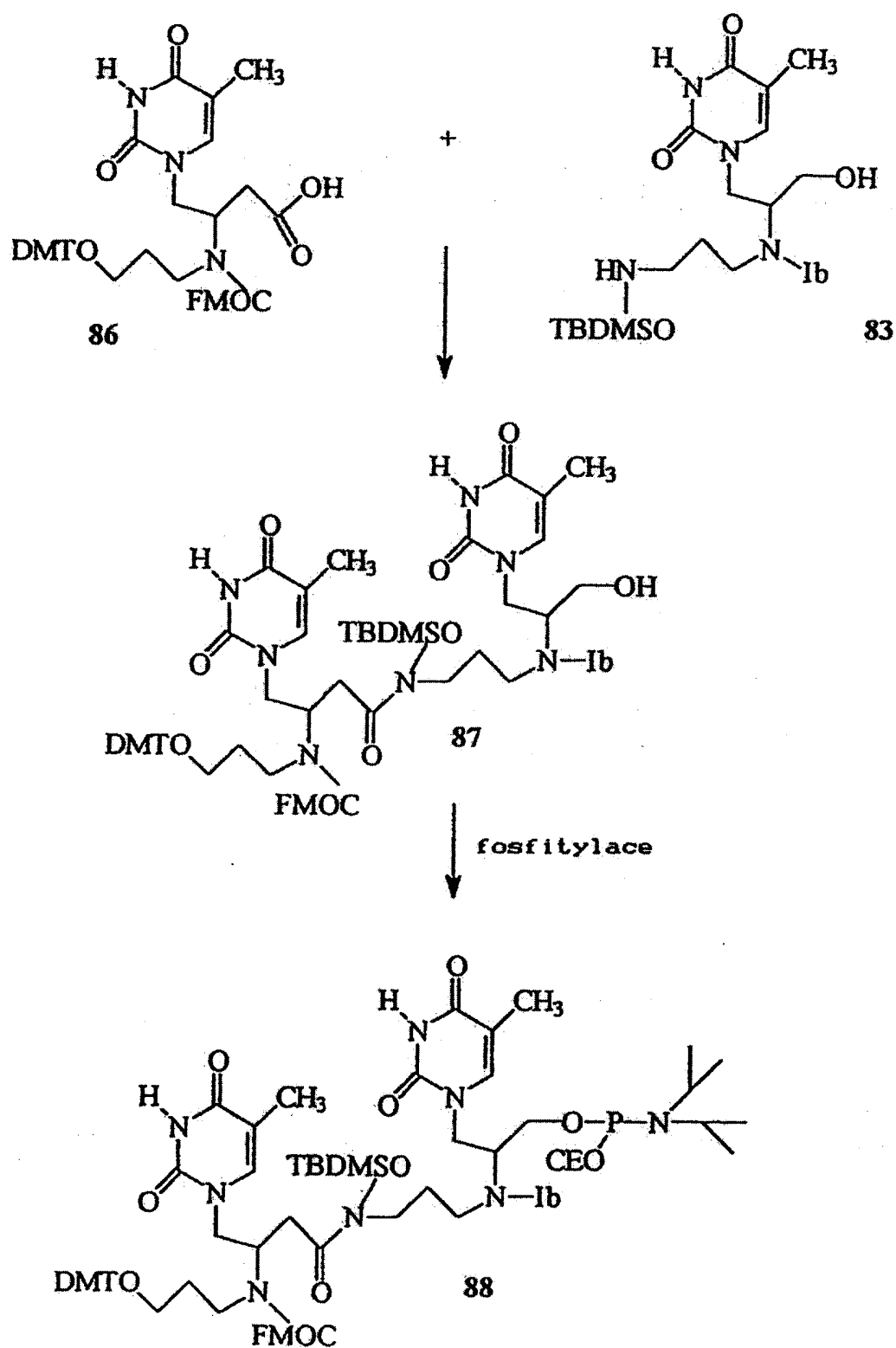


Fig. 9 (pokračování z předešlé strany)

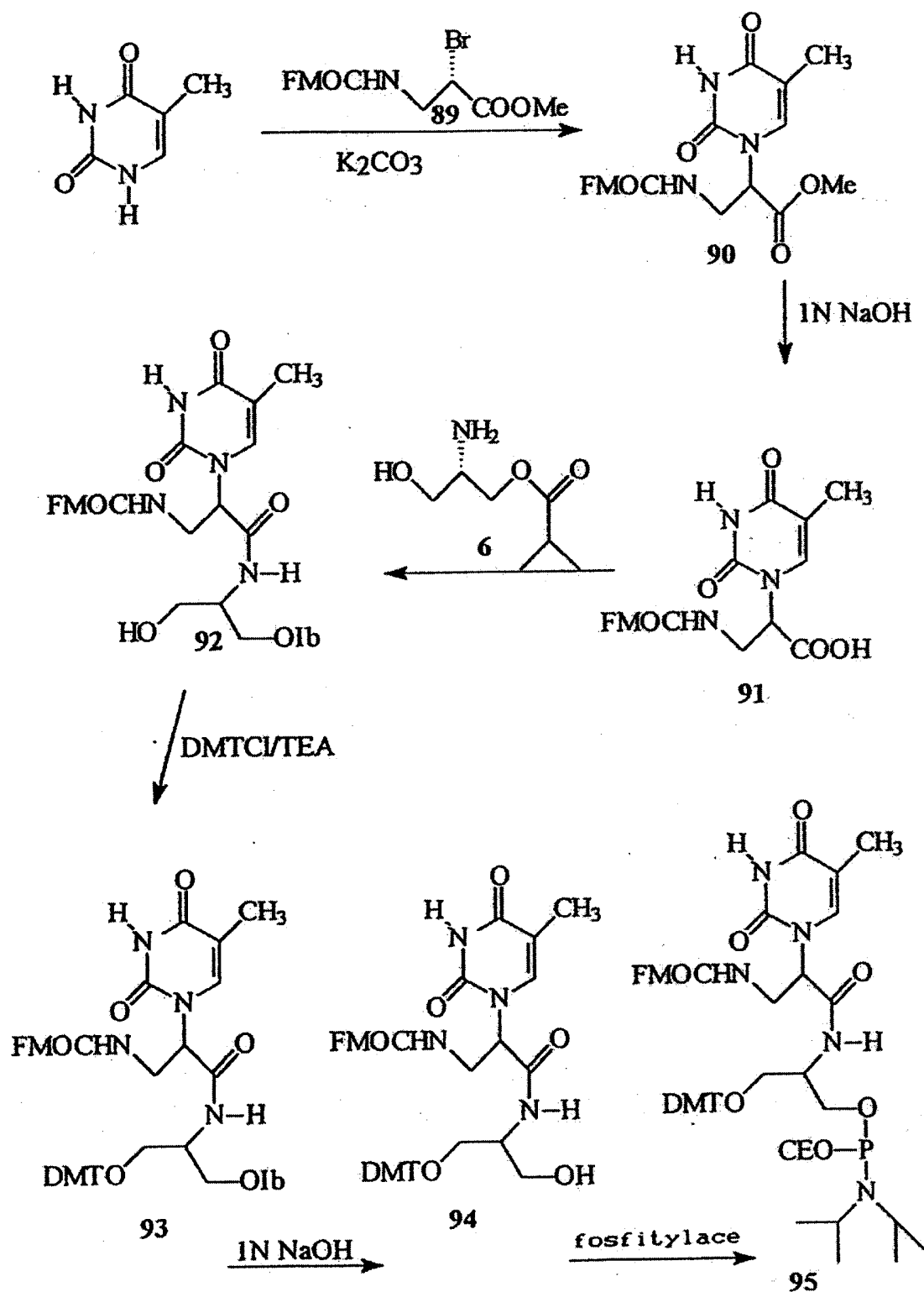


Fig. 10

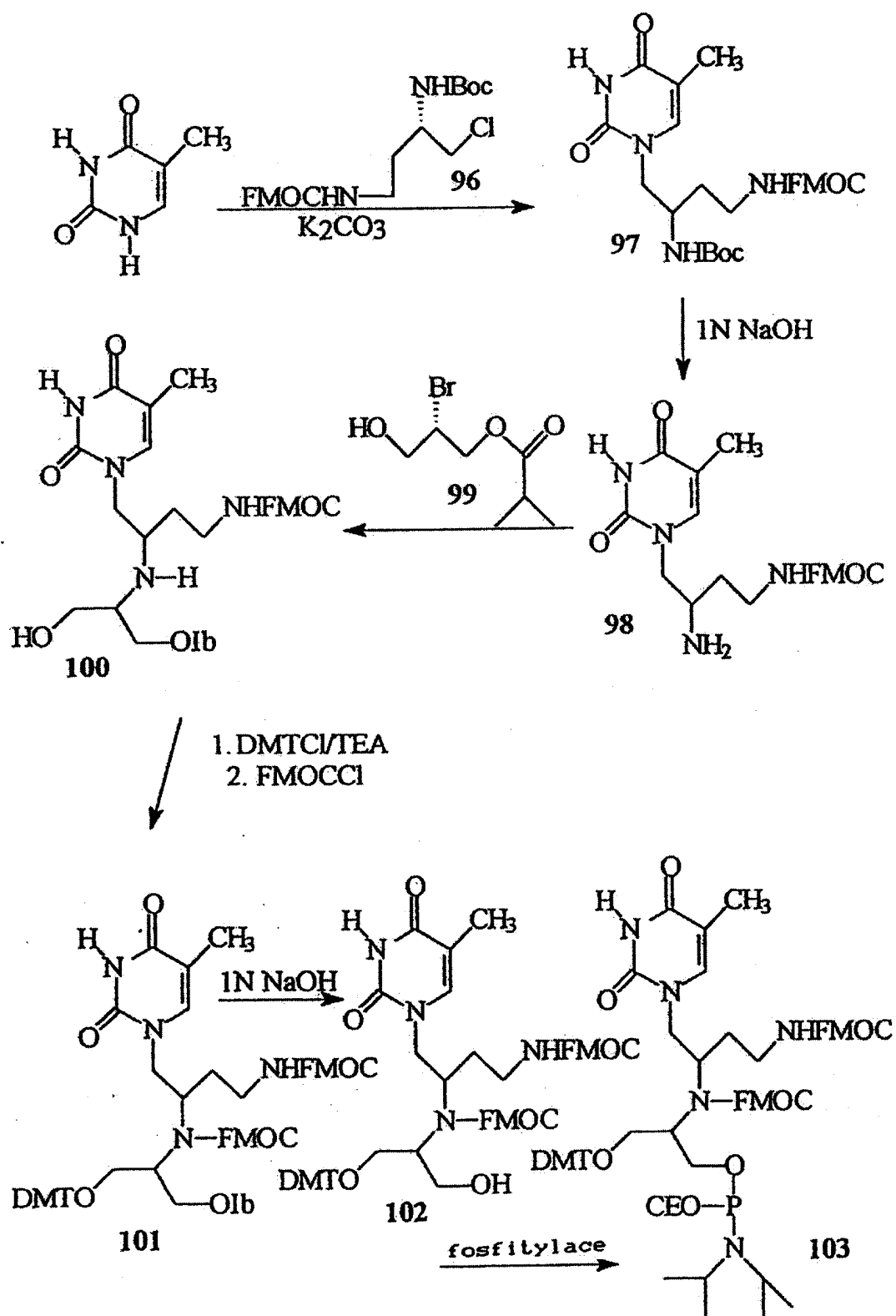


Fig. 11

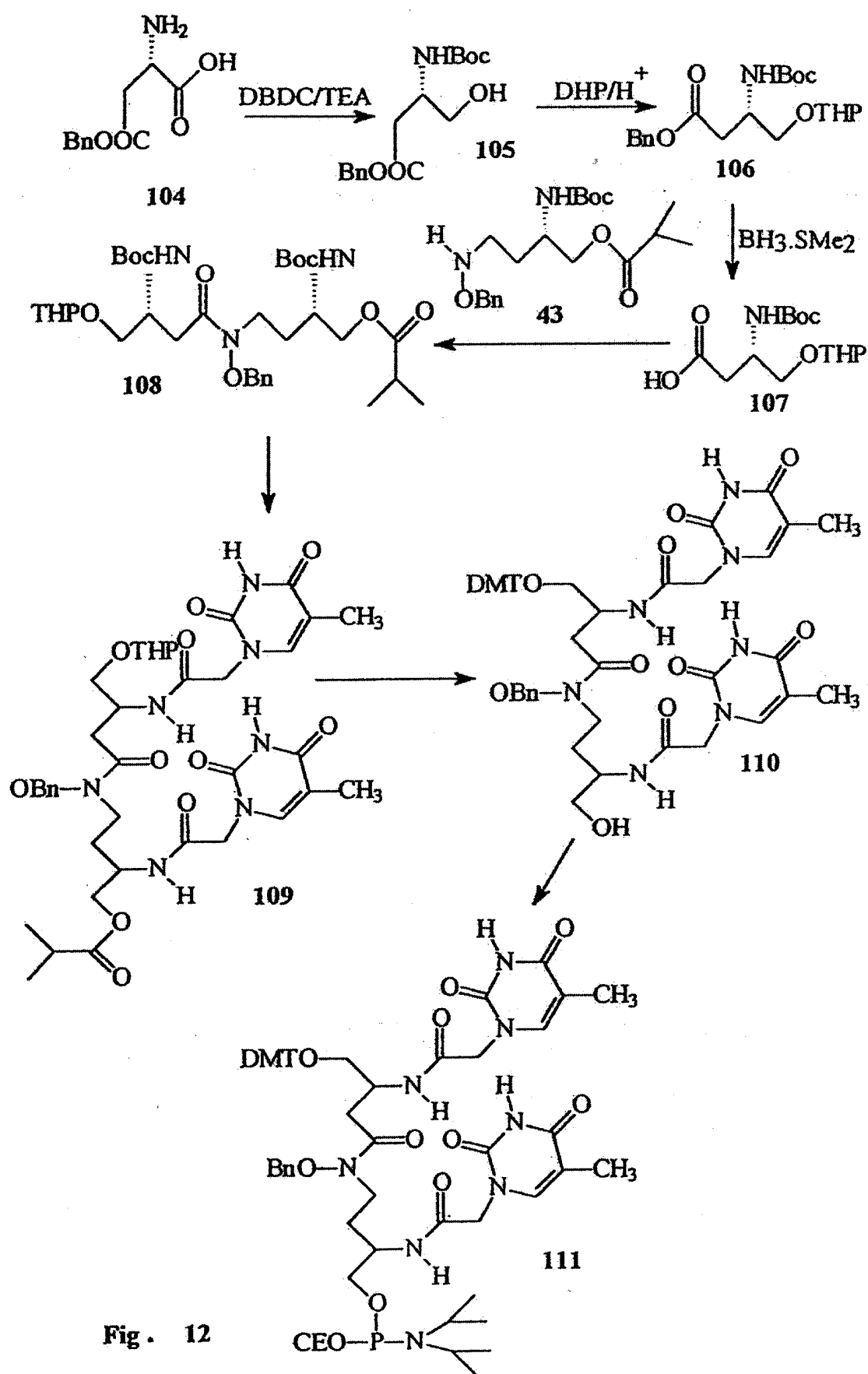


Fig. 12

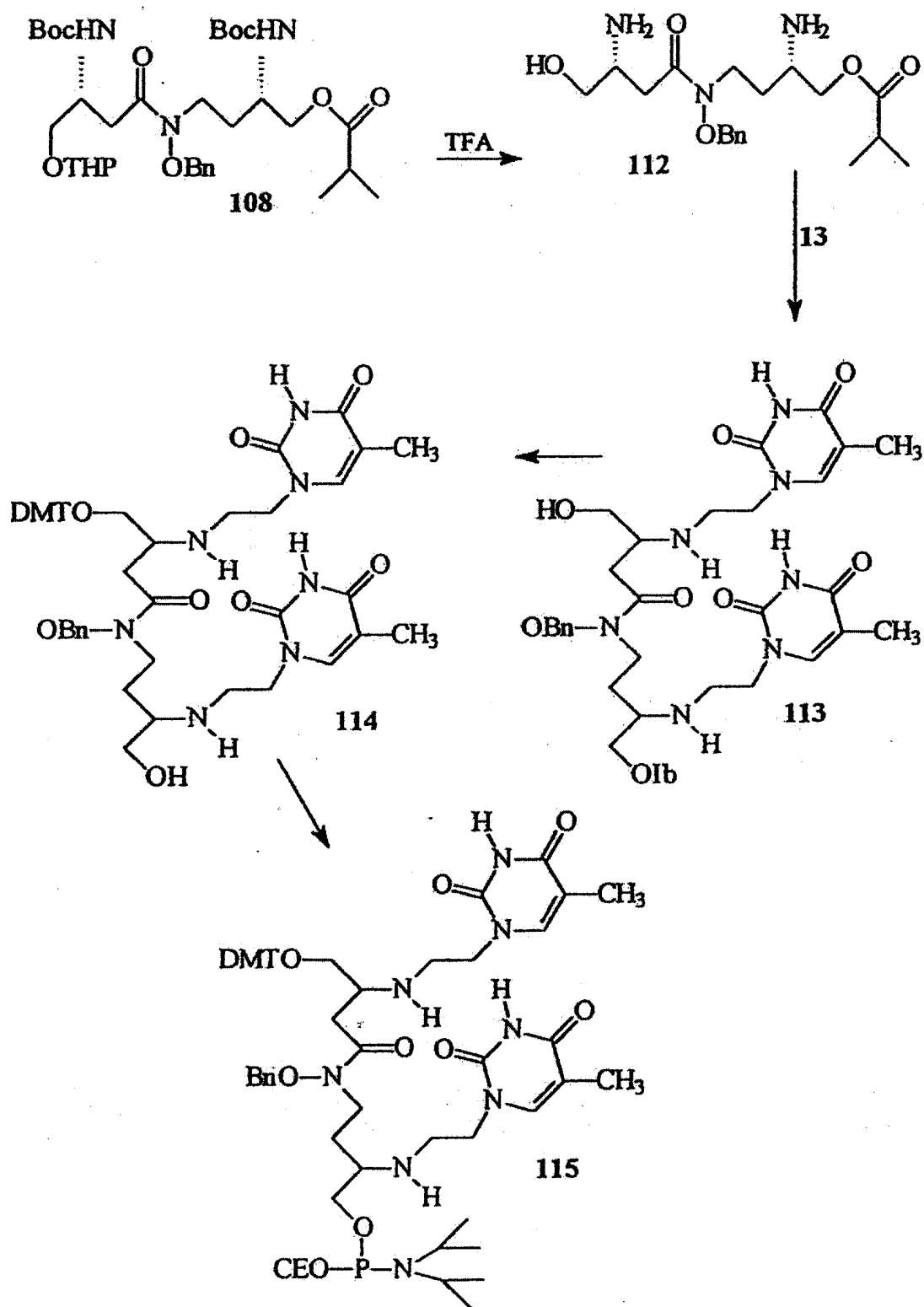


Fig. 13

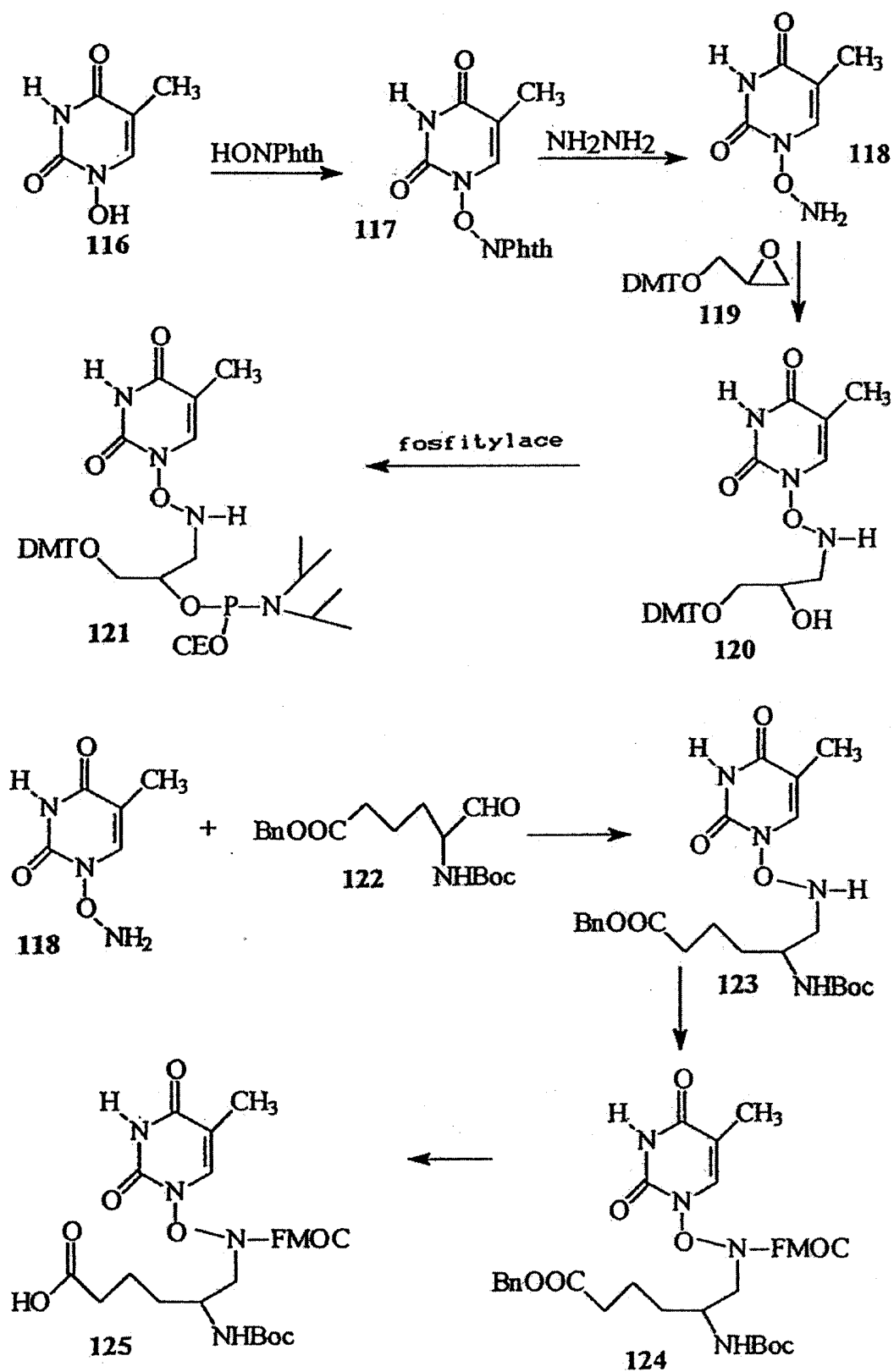


Fig. 14

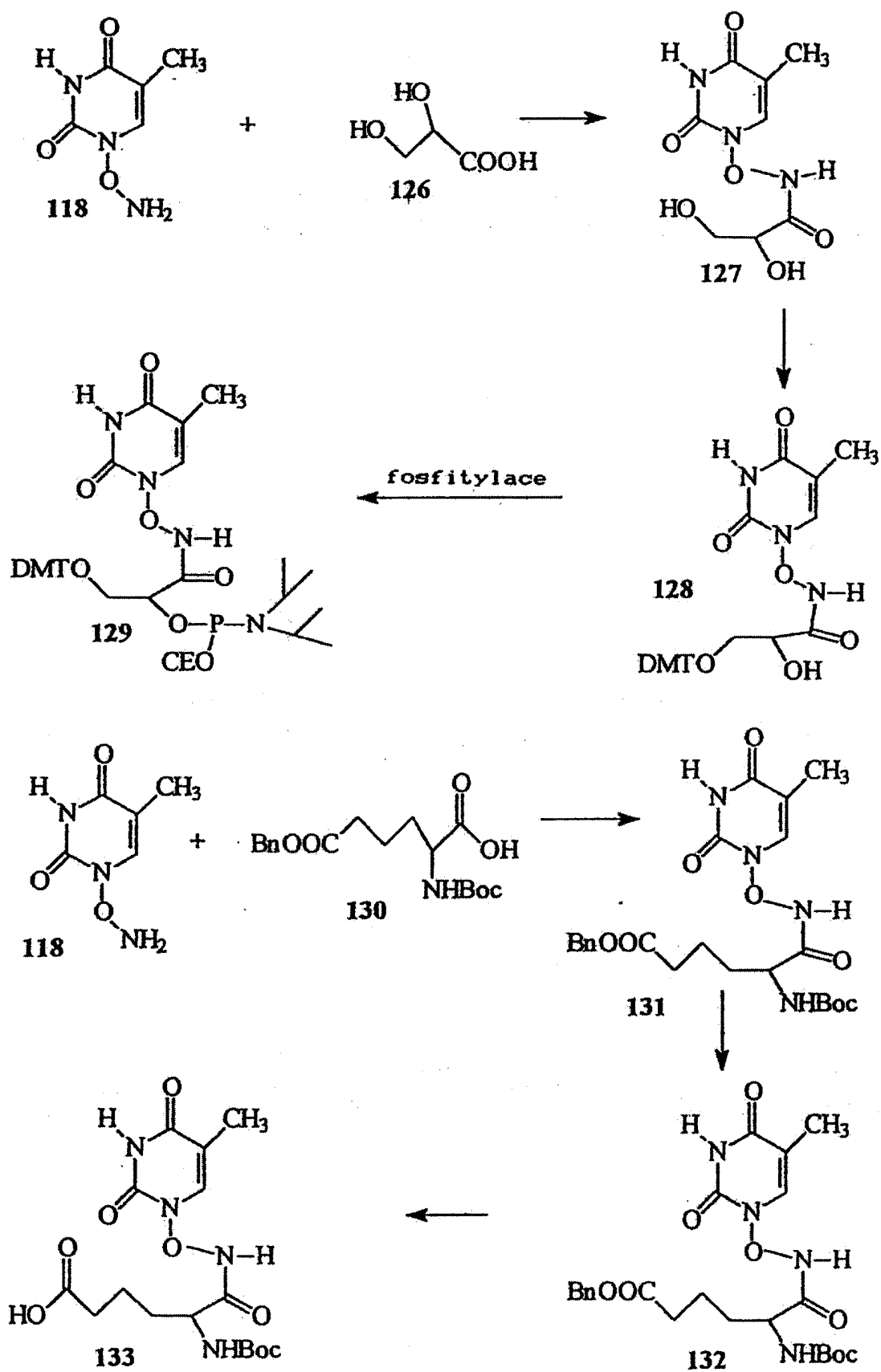


Fig. 15

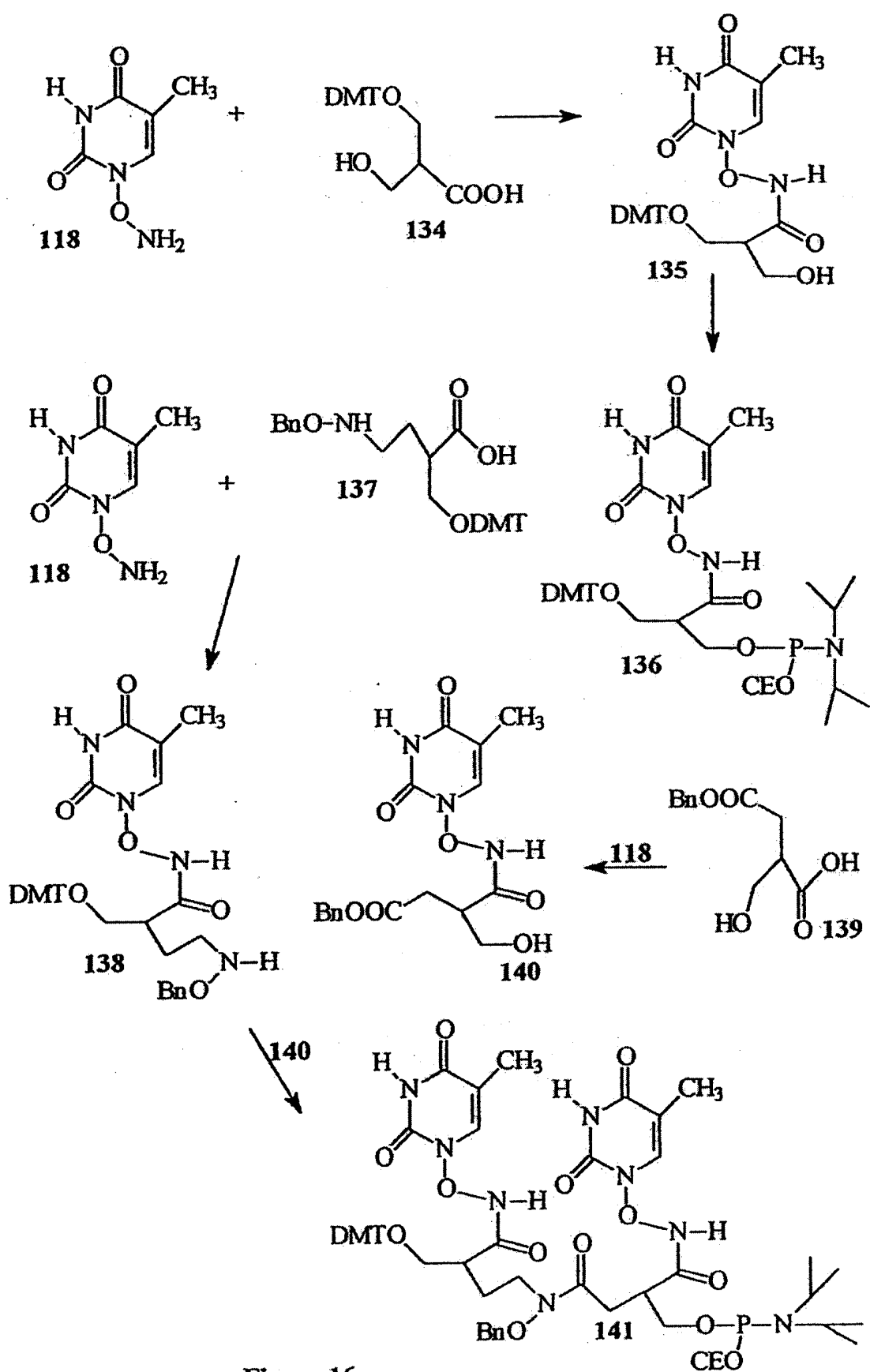


Fig. 16

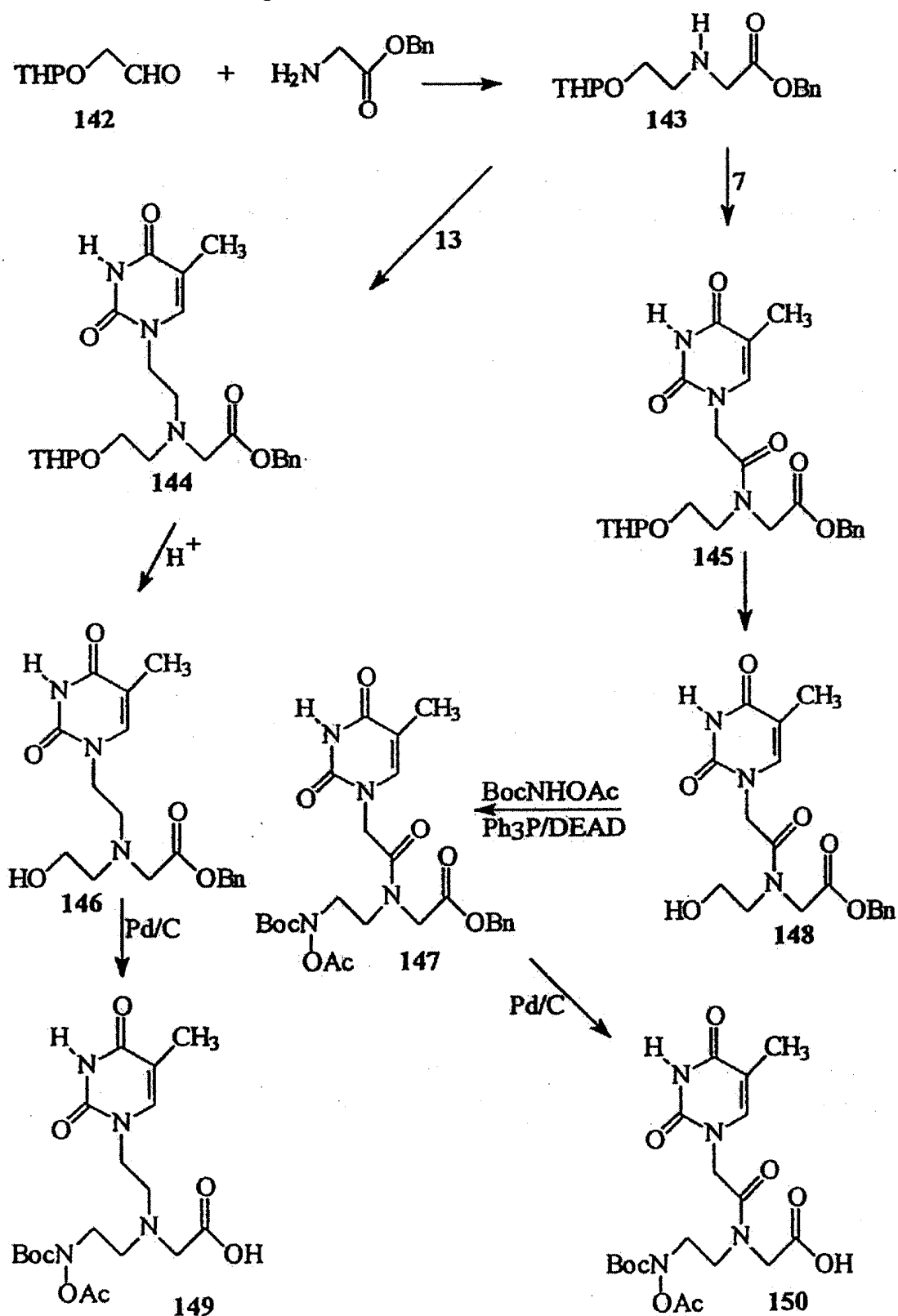


Fig. 17

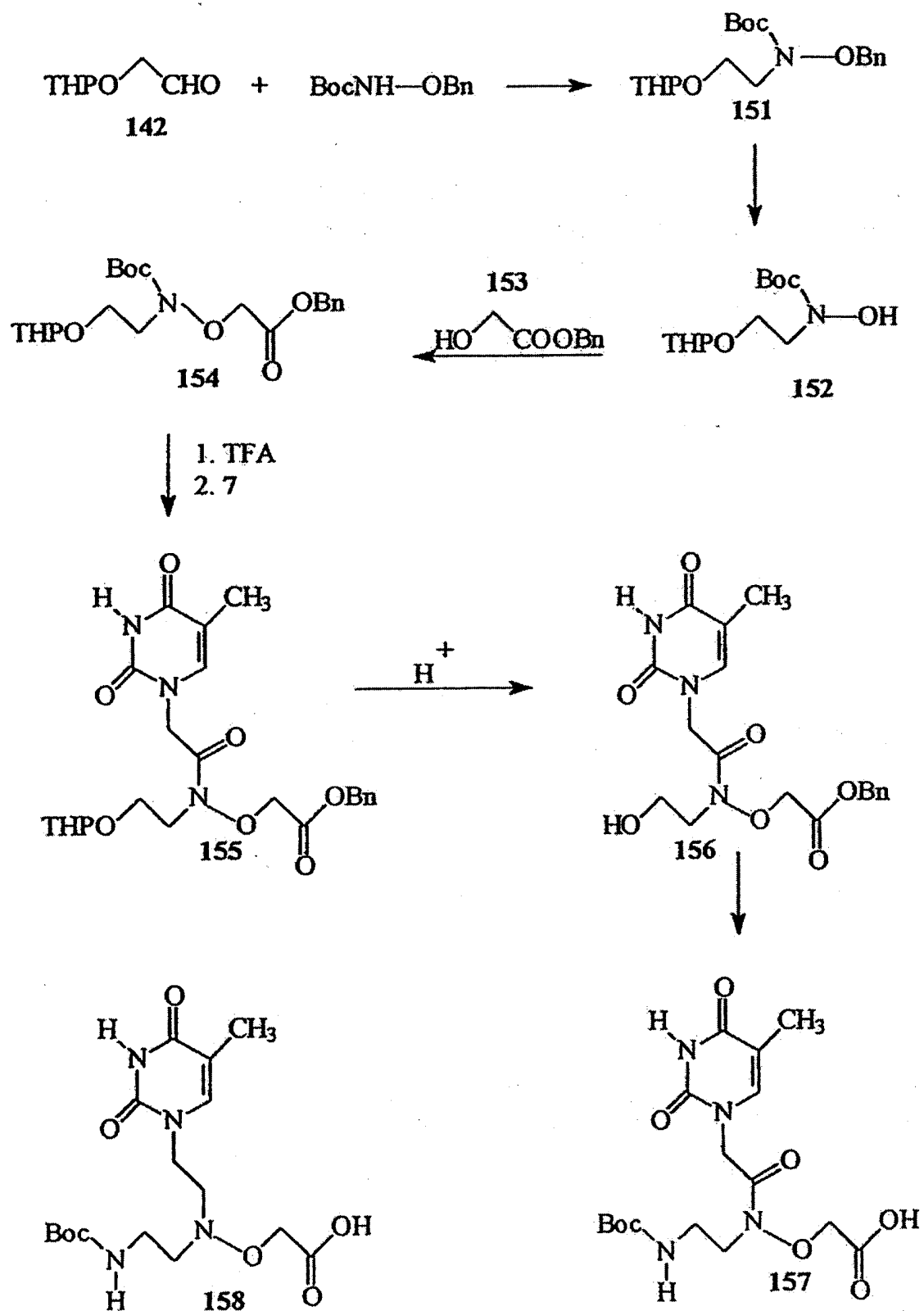


Fig. 18

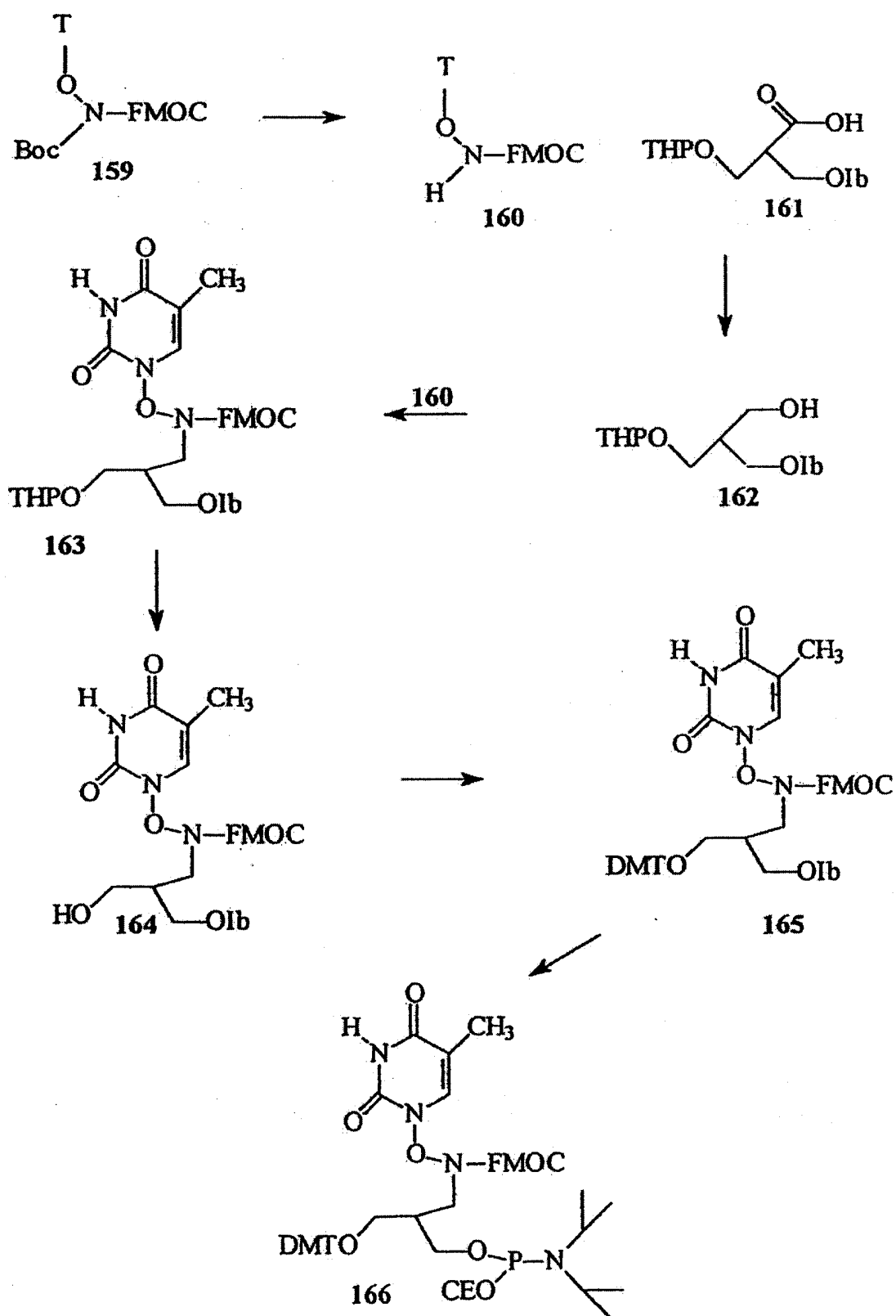


Fig. 19

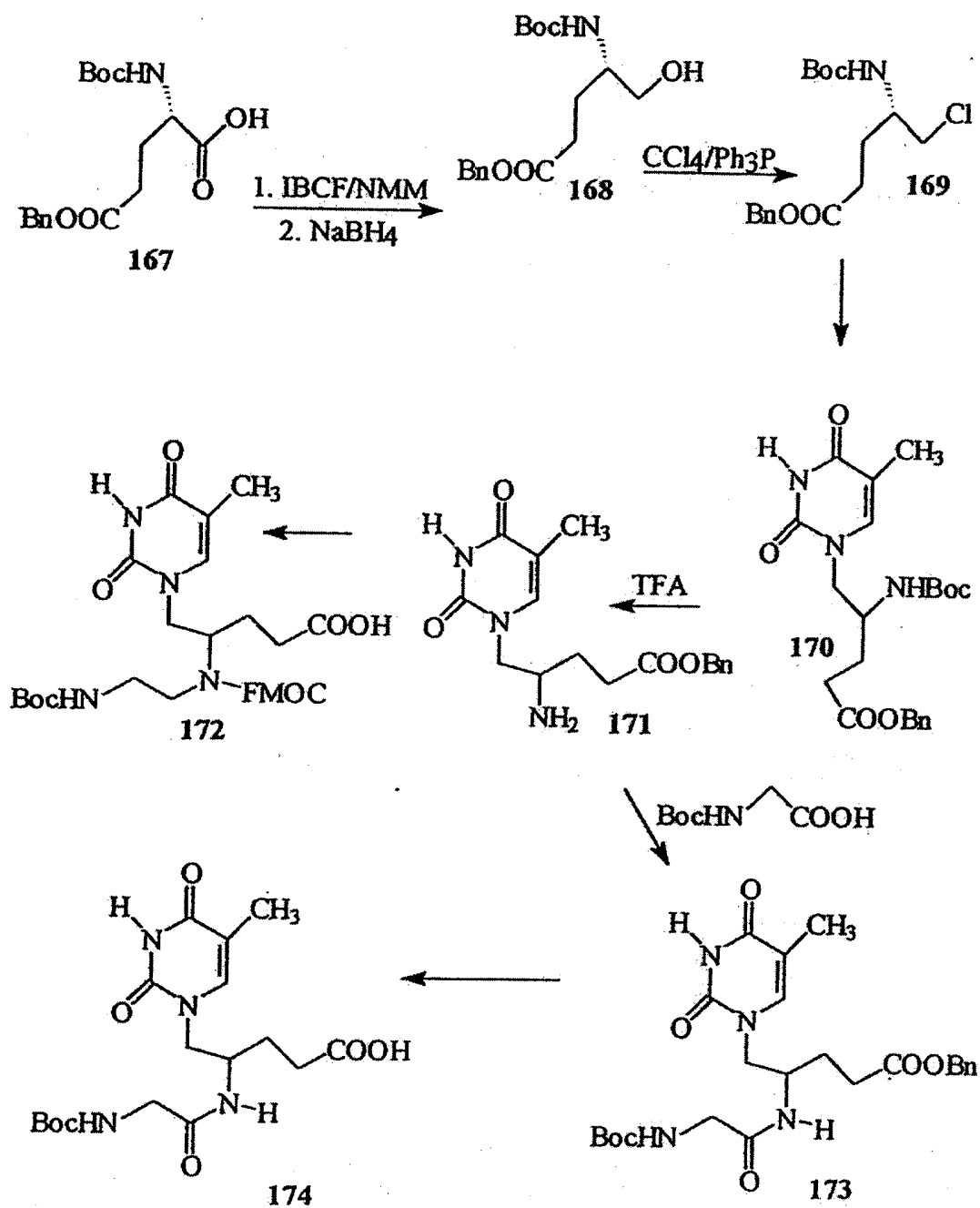


Fig. 20

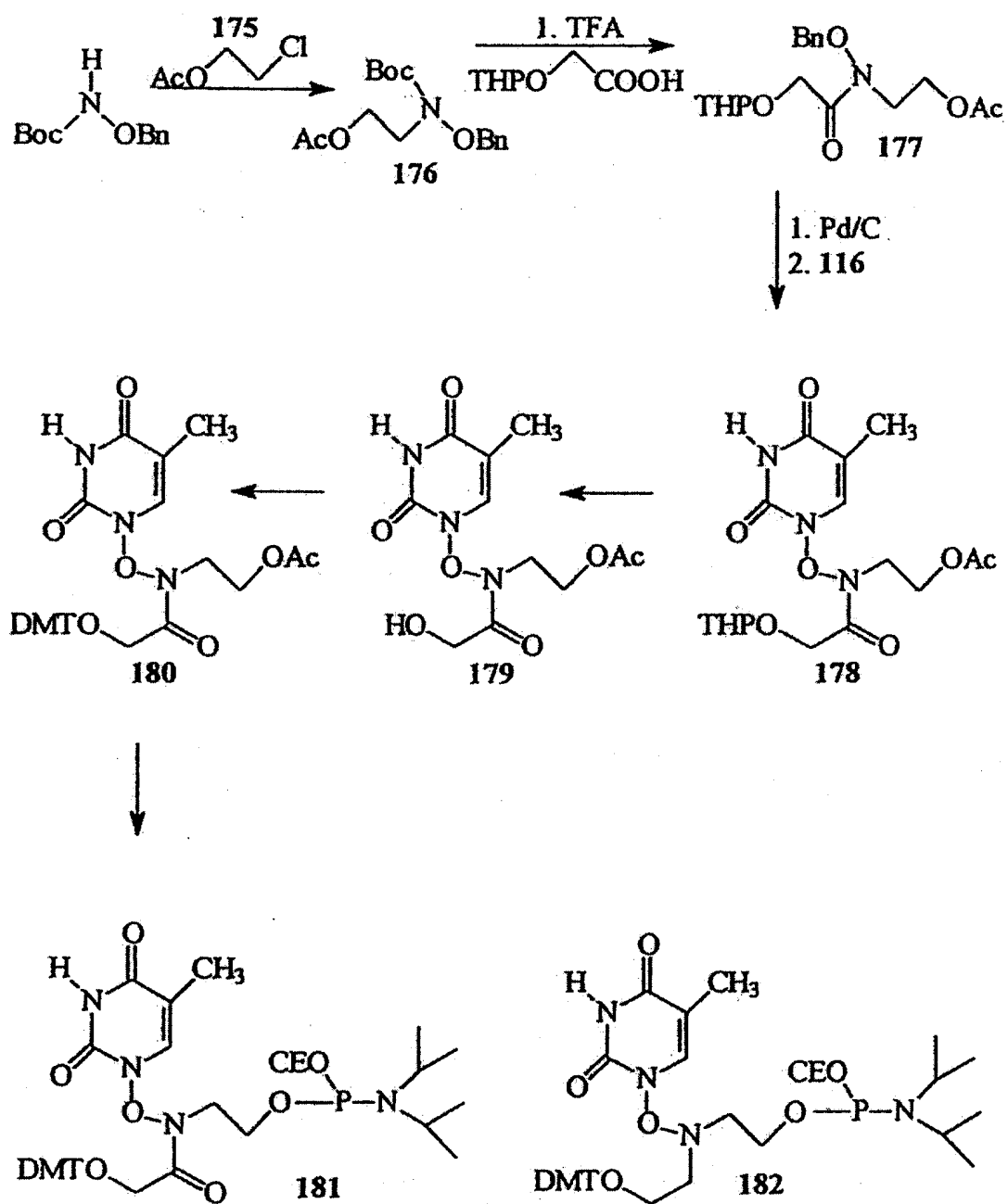
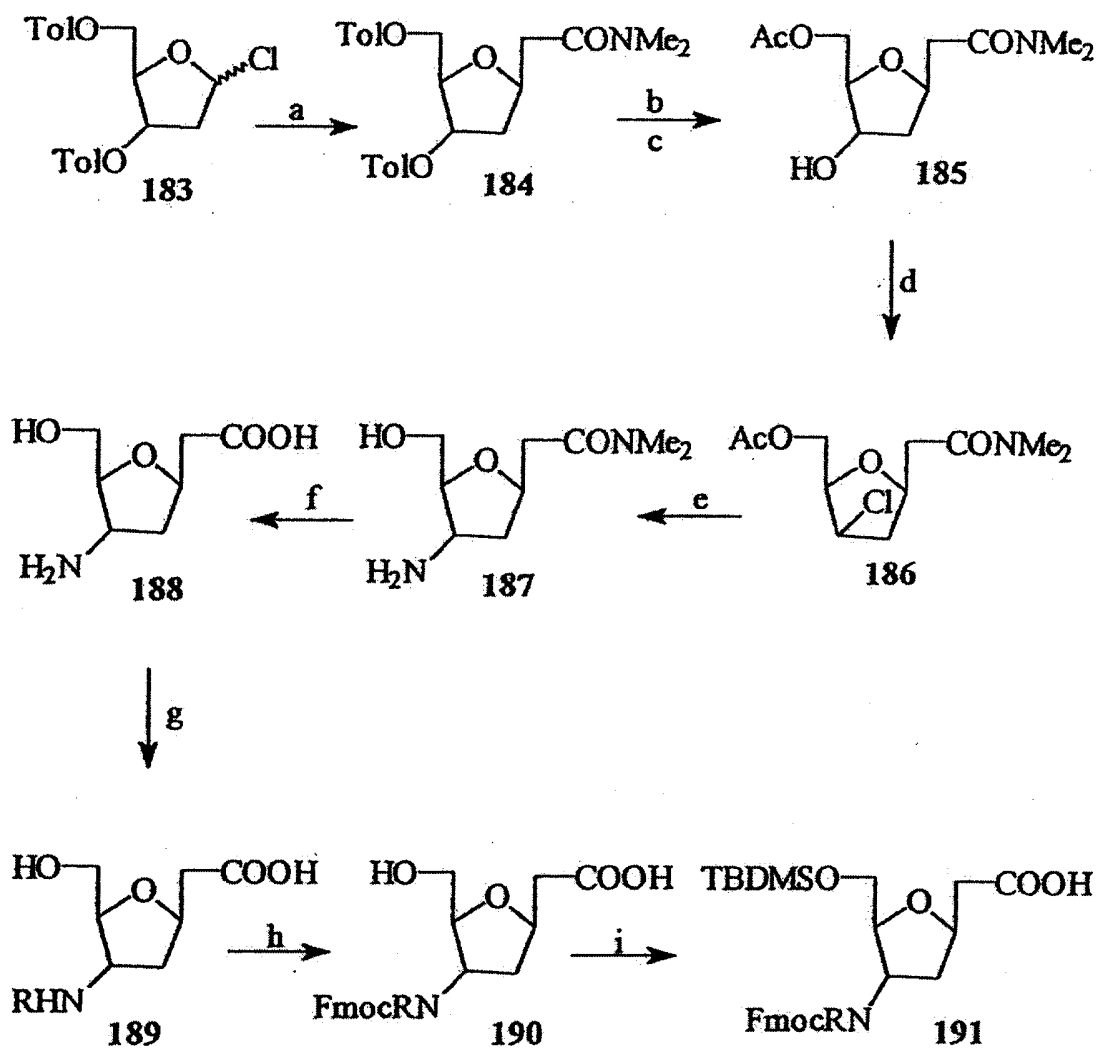
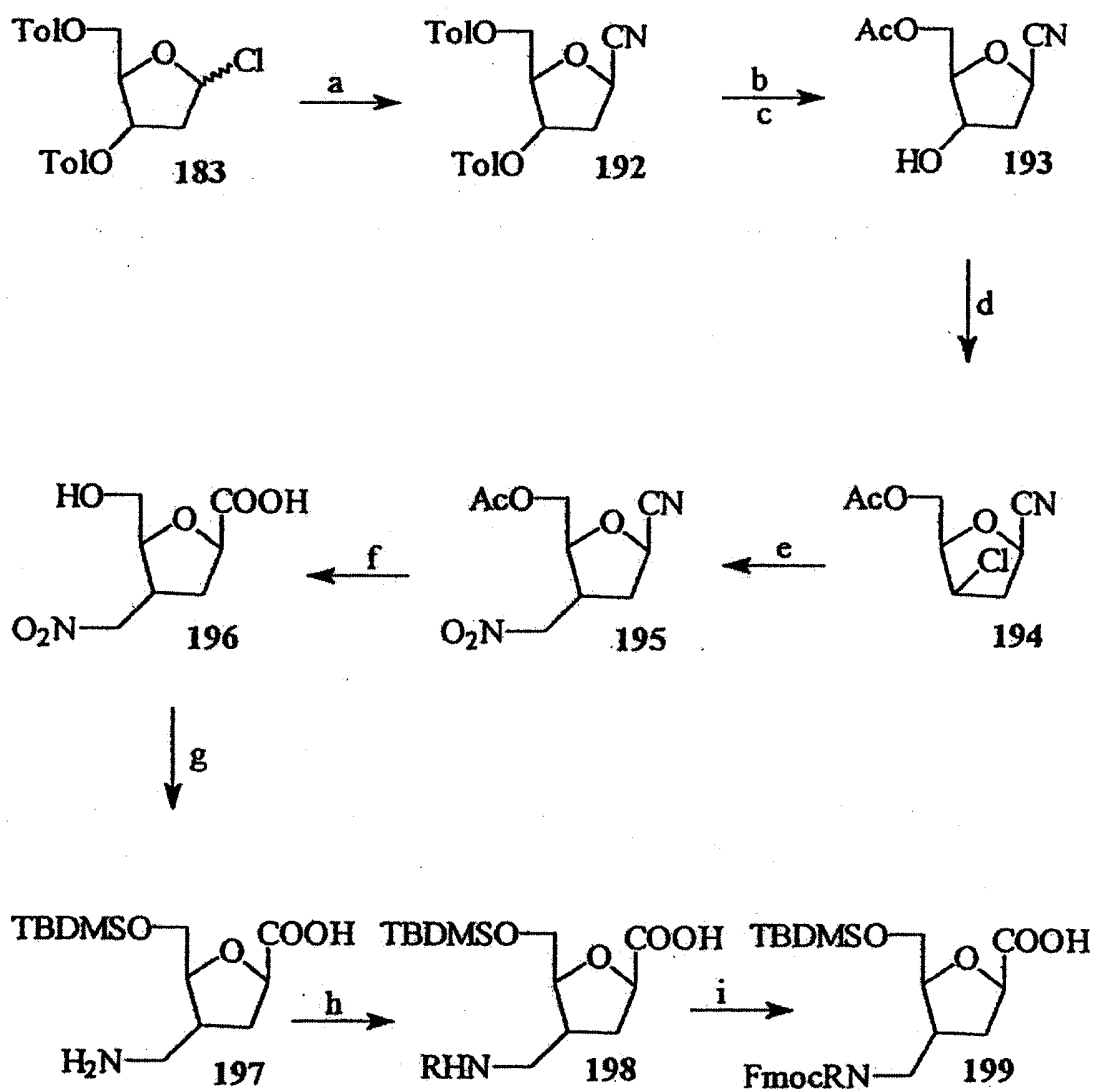


Fig. 21



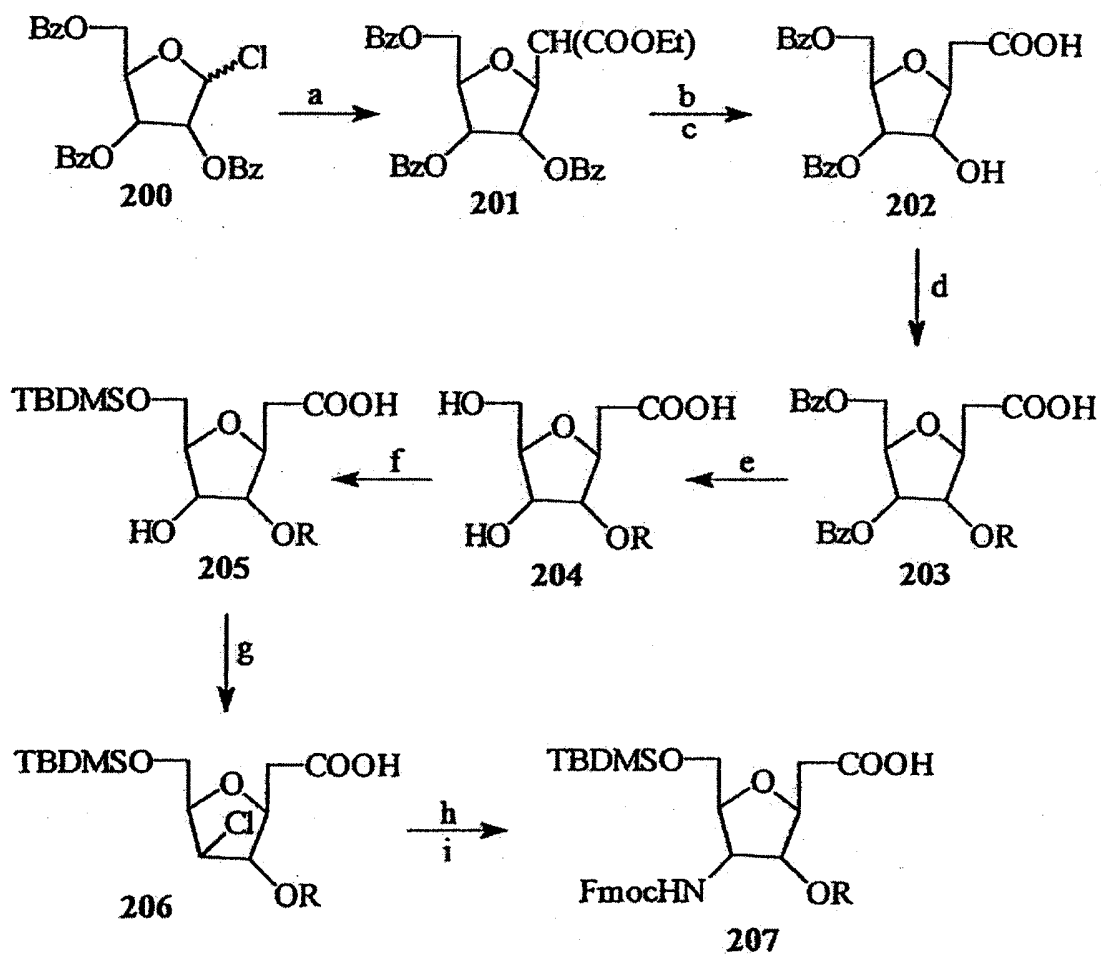
a) ICH₂CONMe₂ a Zn, b) H₂O/NaHCO₃, c) Ac₂O, d) Ph₃P, CCl₄, e) NH₃,
 f) NaOH/H₂O, g) BrCH₂B, kde B je chráněno nukleobazí
 h) Fmoc-Cl, i) TBDMSi-Cl.

Fig . 22



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

Fig. 23



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

Fig. 24

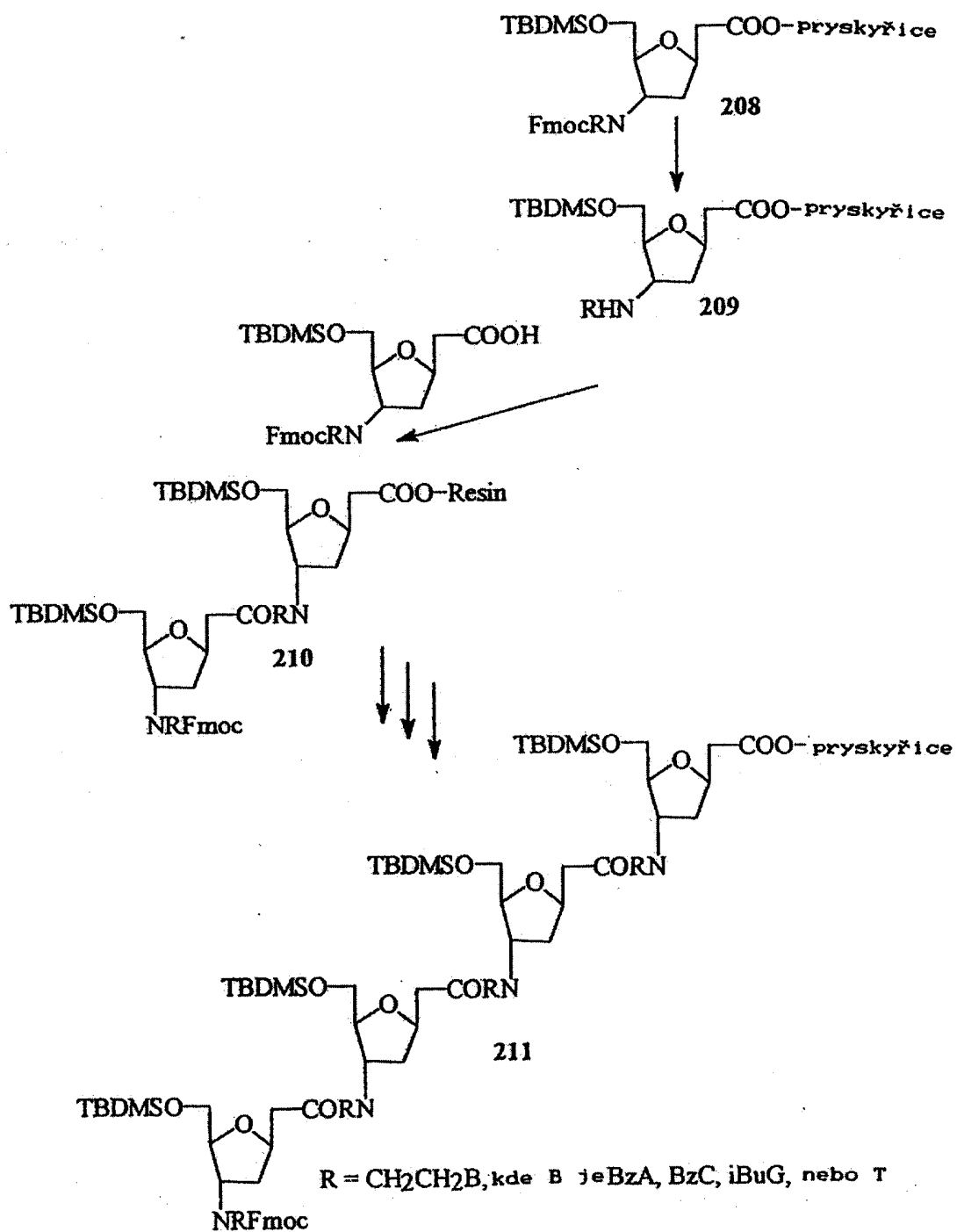


Fig. 25

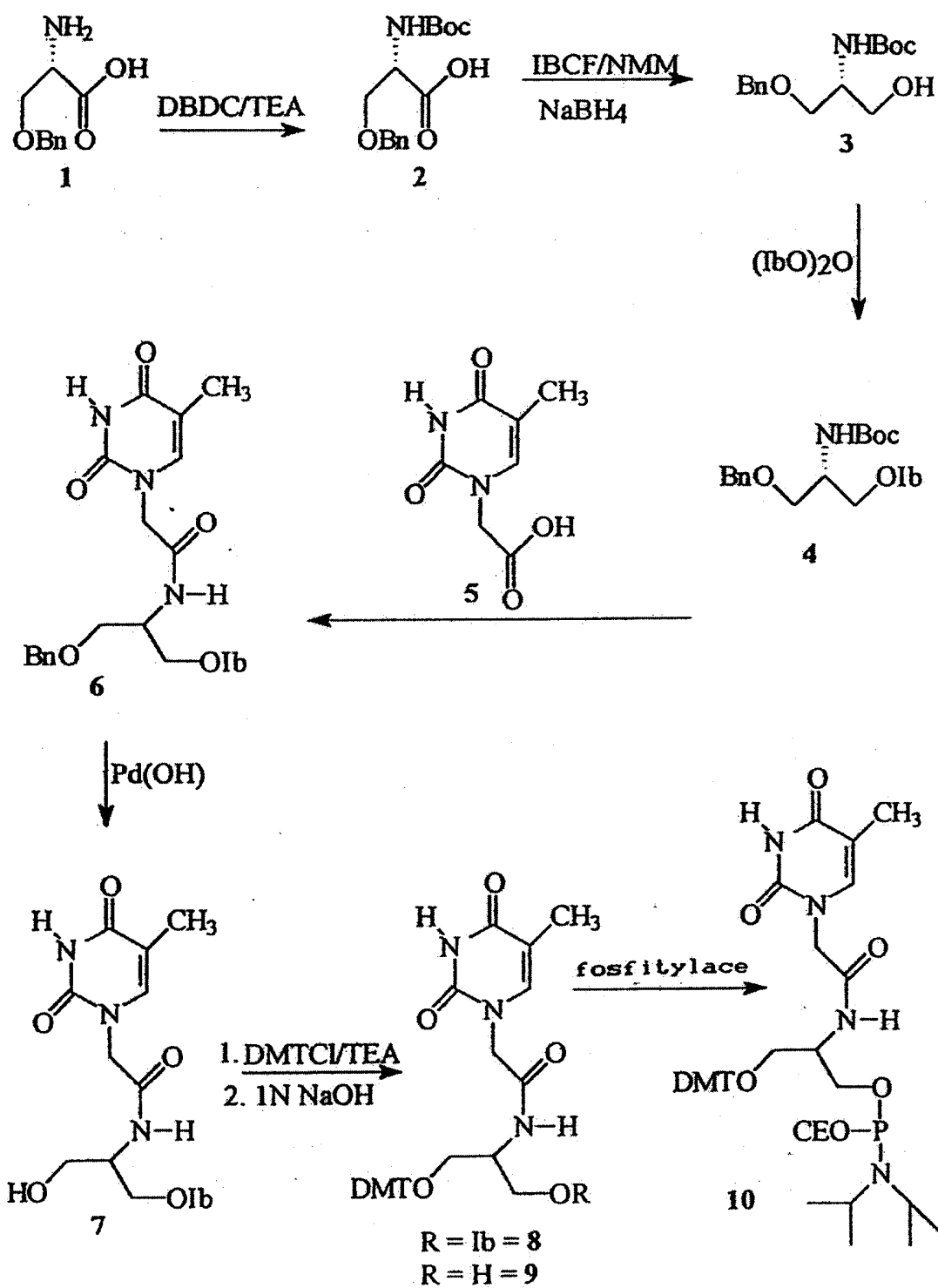


Fig. 26

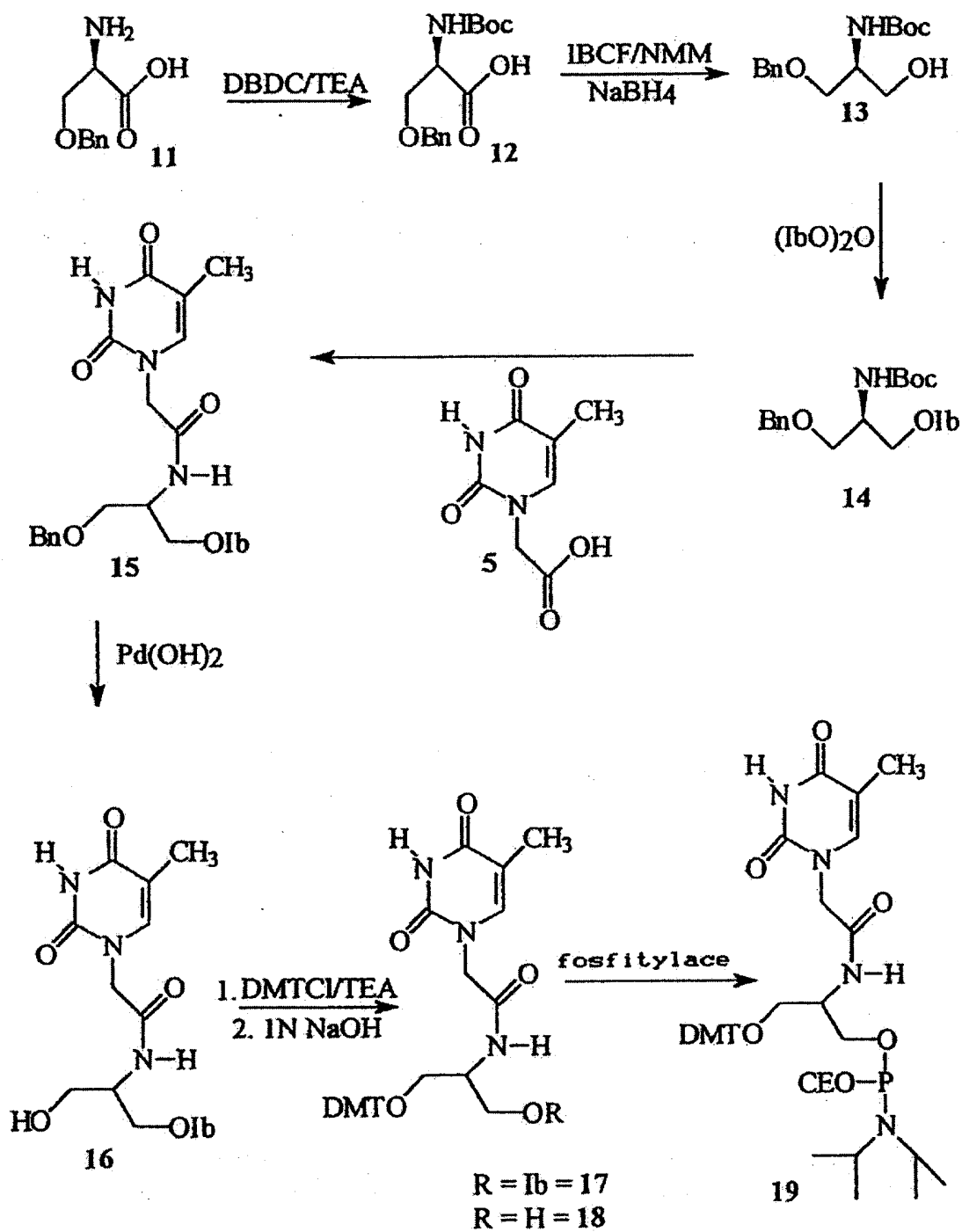


Fig. 27

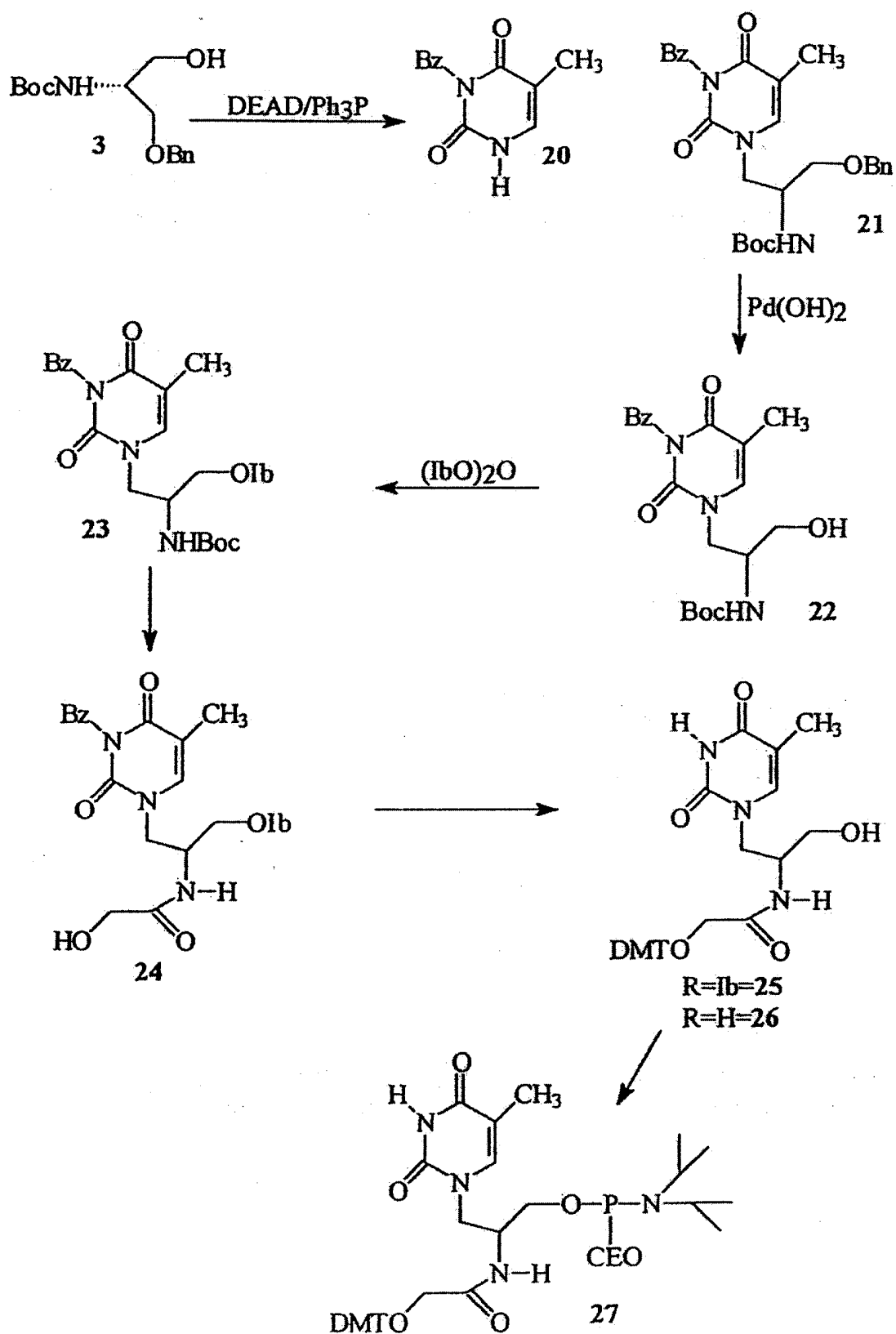


Fig. 28

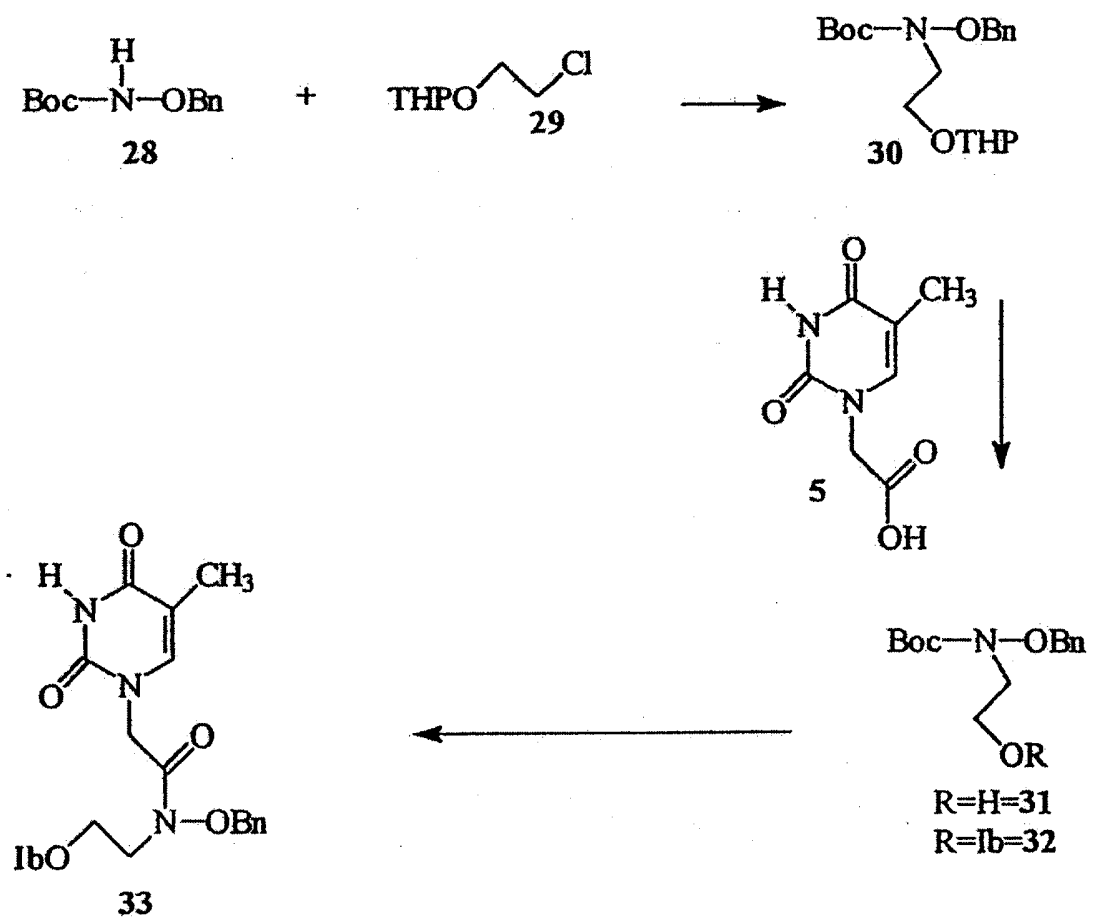


Fig. 29

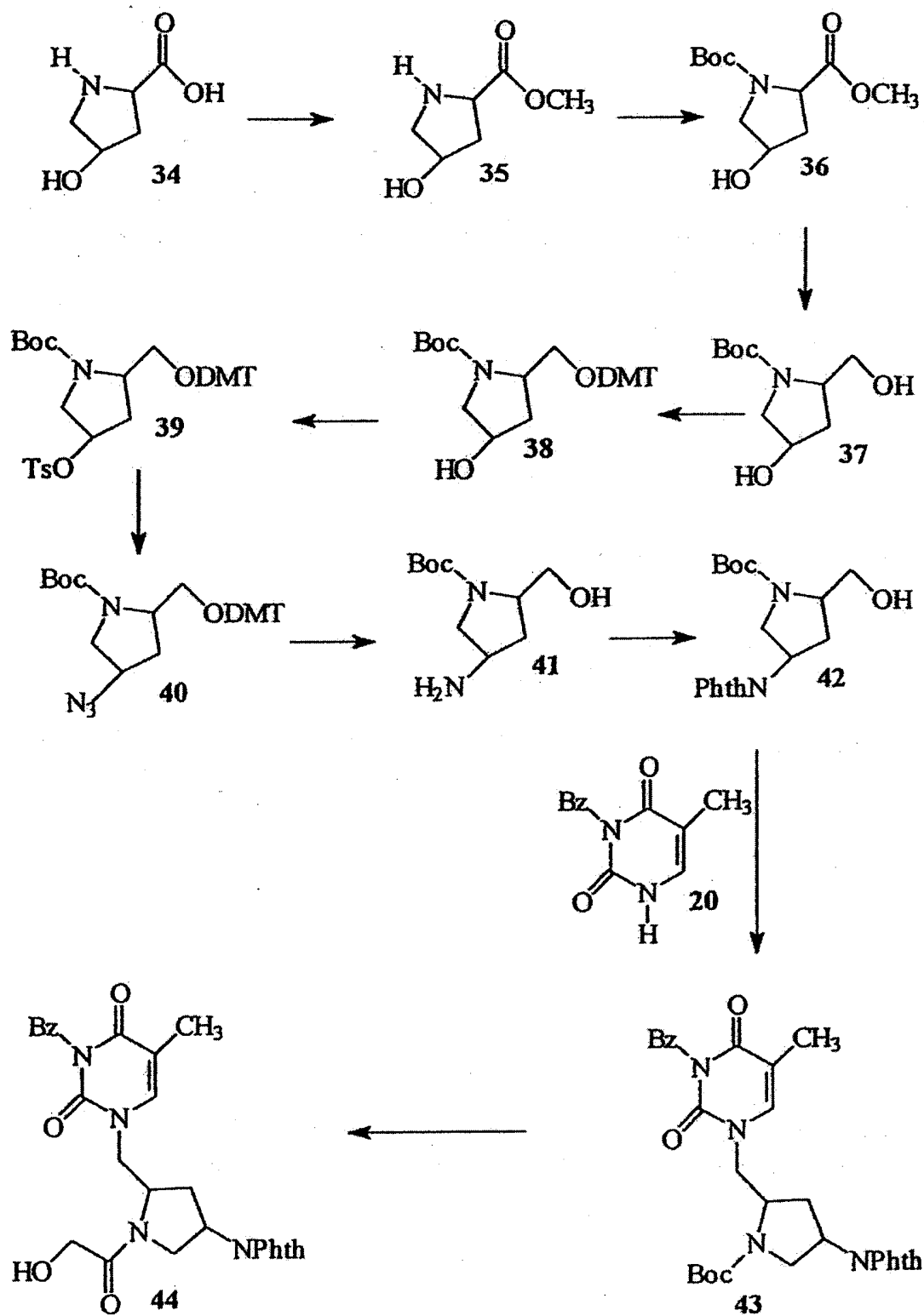


Fig. 30

Konec dokumentu