

**Eljárás nukleozidok sziloxán hiddal történő
összekapcsolására**

STERLING WINTHROP INC., New York, New York,

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés napja: 1991. 09. 05.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/06290

Elsőbbsége: 1990. 09. 12. (581,502)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Kivonat

A találmány tárgya eljárás nukleozidok sziloxán-hiddal történő összekapcsolására, amelynek során egy 3'-szililezett-5'-védett nukleozidot egy védőcsoport nélküli nukleoziddal reagáltatunk. A szililezett és a védőcsoport nélküli nukleozid lehet monomer nukleozid vagy egy oligonukleotid vagy oligonukleotid analóg terminális nukleozidja. A találmány kiterjed a sziloxán-hiddal összekötött nukleozidokat tartalmazó oligonukleotid analógok előállítására, amelynek során egy 5'-védett nukleozidot bifunkcionális szililező reagenssel szililezünk, a 3'-szililezett nukleozidot védőcsoport nélküli nukleoziddal reagáltatjuk bázis katalízis jelenlétében, és ezeket a lépéseket a kívánt oligonukleotid analóg előállításáig ismételjük.

692/93

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

02094

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA KFT.

Budapest

54555^A

NS205 CO7H 23/00

Eljárás nukleozidok sziloxán hiddal történő
összekapcsolására

STERLING WINTHROP INC., New York, New York,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók:

WEIS Alexander Ludvik, Berwyn, Pennsylvania
SAHA Ashis Kumar, Frazer, Pennsylvania
HAUSHEER Frederick Herman, San Antonio, Texas

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés napja: 1991. 09. 05.

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US91/06290

Elsőbbsége: 1990. 09. 12. (581,502)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/04364

A találmány tárgya eljárás nukleozidok sziloxán-hiddal történő összekapcsolására, amelynek során egy 3'-szililezett nukleozidot egy védőcsoport nélküli nukleoziddal reagáltatunk. A találmány kiterjed legalább egy sziloxánnal összekötött, nukleozidot tartalmazó oligonukleotidok előállítására.

A nukleinsavak, az RNS és DNS, a természetben előforduló oligonukleotidok. A jelen esetben az oligonukleotid kifejezés alatt nukleozidok homopolimer vagy heteropolimer szekvenciáját értjük, amelyekben a nukleozidokat foszfodiészter-hidak kötik össze.

A kémiai technológia fejlődésével több száz nukleozidból vagy bázisból álló oligonukleotidok szintetikus előállítása vált lehetségessé (Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach. M.J. Gait, IRL Press, Washington, D.C. USA (1984)). A szintetikus oligonukleotidok fontos tudományos és terápiás szerepet játszanak. A szintetikus oligodezoxinukleotidok például széles körben alkalmazhatók a rekombináns DNS technika területén. Az utóbbi években kimutatták, hogy a szintetikus oligonukleotidok terápiás célból antiszenz szerként alkalmazhatók a gén kifejeződés gátlására (Uhlman E. és Peyman A.: Chemical Reviews, 90(4), 544-583 (1990)).

Az antiszenz szer olyan vegyület, amely a megcélzott nukleinsav, így RNS vagy DNS, nukleotid szekvenciájához kötődik vagy hibridizálódik, és így gátolja annak funkcióját. Mivel az antiszenz szerek akár az RNS-sel, akár a DNS-sel hibridizálódnak, a gén kifejeződést az átírás, az RNS

feldolgozás vagy lefordítás szintjén gátolják.

Jelenleg azonban az antiszensz szerek gyakorlati, tudományos és terápiás alkalmazását különböző technikai problémák gátolják (Klausner A.: *Biotechnology*, 8, 303-304 (1990); Armstrong L.: *Business Week*, 1990. március 5.).

Problémát jelent például

- (1) az endogén nukleázok által okozott bomlás,
- (2) az előállítás magas költsége,
- (3) a cél nukleinsavval történő szekvencia specifikus hibridizálás hiánya,
- (4) a királis foszforatom miatt az egységesség hiánya és
- (5) a kívánt célmolekulához történő elszállítás nehézségei, például az egyes komponensek elégtelen oldódása, a membrán transzport és a celluláris nyomkövetés elégtelensége miatt.

A stabil, a nukleázokkal szemben rezisztens, olcsón előállítható, és a célszekvenciához könnyen elszállítható és azzal könnyen hibridizálódó antiszensz szerek előállításának egyik lehetséges módja az internukleozid kötések módosítása.

A jelen esetben "oligonukleotid analóg" kifejezés alatt nukleozidok vagy analógjai olyan homopolimer vagy heteropolimer szekvenciáját értjük, amelyek foszfodiésztertől eltérő nukleozid közötti kötések tartalmazzak.

Általában két oligonukleotid analóg típus ismert. Az első típus módosított foszfát kötések, a második típus nem-foszfát kötések tartalmaz (lásd Uhlman E. idézett

műve).

A nem-foszfát típusu internukleozid kötésekre példaként említhetők a sziloxán, karbamát, karboxi-metil-észter, acetamidát, karbonát és tioéter kötések (lásd Uhlman E. idézett műve).

A találmány vonatkozásában elsősorban a sziloxán kötések vagy hidak lényegesek.

A nukleozidok között sziloxán-hid kötések tartalmazó dimer és hexamer nukleozidok és ezek előállítása ismert (Ogilvie K.K. és Cormier J.F.: Tetrahedron Letters, 26(35), 4159-4162 (1985); Cormier J.F. és Ogilvie K.K.: Nucleic Acids Research, 16(10), 4583-4594 (1988)).

Az ismert eljárások szerint egy 5'-védett nukleozidot egy szililező reagenssel reagáltatnak, majd a kapott 3'-szililezett nukleozidot egy védett nukleoziddal kapcsolják, és így teljes egészében védett, 3',5'-szilil-hidat tartalmazó dinukleozidot kapnak. A védőcsoportot az egyik terminális nukleozidról eltávolítva további, védett nukleozidokkal végzett kapcsolási ciklusokkal állítják elő a kívánt láncot.

Ennél az eljárásnál bizonyos hátrányok jelentkeznek. Nukleozid polimer szintézise során a kívánt végterméket mintegy 35-46 %-os kitermeléssel kapják. Az alacsony kitermelés nemkivánt melléktermékek kialakulásának, így 3',3'-szimmetrikus dimer kialakulásának köszönhető (Uhlman E. idézett műve), ami a nukleozid építőelemek önkonjugációja miatt következik be. Jelentős veszteséget okoz továbbá a

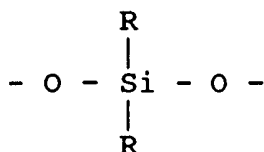
polimer védőcsoportjainak eltávolítása.

A találmány értelmében a nukleozid egységeket úgy kapcsoljuk össze sziloxán-hiddal, hogy megakadályozzuk a 3',3'-dimer kialakulását. Az eljárás értelmében egy szililezett nukleozidot védőcsoport nélküli nukleoziddal reagáltatjuk gátolt bázis katalizis jelenlétében. A védőcsoport nélküli nukleozid alkalmazása az Ogilvie és Cormier által javasolt eljárással összehasonlítva azzal az előnnyel jár, hogy nő a kívánt végtermék kitermelése, és a szintézis hatékonysága (ezáltal csökkennek a költségek).

A találmány szerinti eljárást előnyösen sztérikusan gátolt bázis katalizis jelenlétében hajtjuk végre, ami minimális szintre csökkenti a nemkívánatos 3',3'-szimmetrikus dimerek kialakulását.

A találmány tárgya tehát eljárás nukleozidok sziloxán-hiddal történő összekapcsolására, amelynek során egy 3'-szililezett-5'-védett nukleozidot védőcsoport nélküli nukleoziddal reagáltatunk gátolt bázis katalizis jelenlétében.

A sziloxán-hid a



képlettel ábrázolható, ahol

R jelentése egymástól függetlenül 1-6 szénatomos alkilcsoport, előnyösen metilcsoport vagy izopropilcsoport.

Szililezett nukleozidként és/vagy védőcsoport nélküli nukleozidként alkalmazhatók monomer nukleozidok, vagy egy

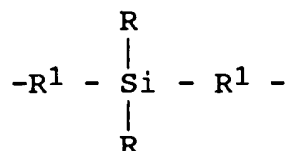
oligonukleotid vagy oligonukleotid analóg 3'- vagy 5'-terminális nukleozidja. Monomer nukleozidként előnyösen alkalmazható a timidin, N⁶-benzoil-dezoxi-adenozin, N⁴-benzoil-dezoxi-citidin és N²-izobutil-dezoxi-guanozin.

A 3'-szililezett-5'-védett nukleozid és a védőcsoport nélküli nukleozid reakcióját előnyösen semleges vagy lúgos, aprotikus oldószerben végezzük. Lúgos, aprotikus oldószerként előnyösen alkalmazható a 2,6-di-terc-butil-4-metilpiridin acetonitril és dimetil-formamid elegyben felvett oldata.

A találmány tárgya továbbá eljárás sziloxán-hiddal összekötött nukleozidokat tartalmazó oligonukleotid analógok előállítására, amelynek során

- a) egy 5'-védett nukleozidot bifunkcionális szililezőszerrel szililezünk,
- b) a 3'-szililezett-5'-védett nukleozidot egy védőcsoport nélküli nukleoziddal reagáltatjuk, és
- c) az a) és b) lépéseket a kívánt oligonukleotid analóg előállításáig ismételjük.

Bifunkcionális szililezőszerként előnyösen alkalmazhatók az (I) általános képletű vegyületek,



a képletben

R jelentése egymástól függetlenül 1-6 szénatomos alkilcsoport és

R¹ jelentése lehasadó csoport.

Előnyösen alkalmazhatók azok a szimmetrikus szililezőszerek, amelyek képletében

R jelentése izopropilcsoport vagy metilcsoport és R¹ jelentése lehasadócsoporthoz, így klóratom vagy -SO₂CF₃ képletű csoport.

Akár 5'-védett nukleozidként, akár védőcsoport nélküli nukleozidként előnyösen alkalmazható a timidin, N⁶-benzoil-dezoxi-adenozin, N⁴-benzoil-dezoxi-citidin vagy N²-izobutil-dezoxi-guanozin.

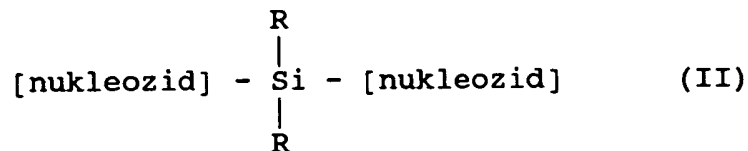
Az a) és b) lépést előnyösen lugos, aprotikus oldószerben, elsősorban 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridin acetonitril és dimetil-formamid elegyében, elsősorban 1:1 térfogatarányú elegyében felvett oldatában végezzük.

A találmány kiterjed továbbá sziloxán-hiddal összekötött nukleozidokat tartalmazó oligonukleotid analógok szilárd fázisu szintézisére, amelynek során

- a) egy 5'-védett nukleozidot a szilárd hordozóhoz kötünk,
- b) a megkötött nukleozid védőcsoportját eltávolítjuk,
- c) a védőcsoport nélküli nukleozidot 3'-szililezett-5'-védett nukleoziddal reagáltatjuk bázis katalízis és semleges vagy lugos, aprotikus oldószer jelenlétében,
- d) a reagálatlan nukleozidokat blokkoljuk,
- e) a b), c) és d) lépést a kívánt hosszúságú oligonukleotid analóg előállításáig ismételjük, és
- f) az oligonukleotid analógot eltávolítjuk a szilárd

hordozóról.

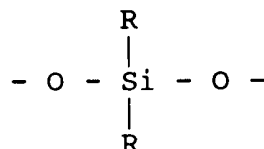
Az oligonukleotid analógban a nukleozidokat összekötő sziloxán-hid a (II) általános képlettel ábrázolható.



A szilárd fázisú eljárásban a találmány szerinti bázis katalizist előnyösen gátolt bázissal, elsősorban 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridinnel végezzük. Általában egy bázis, így imidazol is jelen van a szililezett köztitermék stabilizálása érdekében. Az említett bázis elősegíti továbbá a kitermelés javítását. Aprotikus oldószerként előnyösen alkalmazható az acetonitril és dimetil-formamid elegye, elsősorban mintegy 1:1 térfogatarányú elegye. A kapott oligonukleotid analóg eltávolítását a szilárd hordozóról előnyösen vizes ammóniával végezzük izopropanolban és acetonitrilben.

Mint fent említettük, a sziloxán-hiddal összekapcsolt nukleozidokat úgy szintetizáljuk, hogy egy 3'-szililezett-5'-védett nukleozidot egy védőcsoport nélküli nukleoziddal reagáltatunk.

A találmány értelmében sziloxán-hid alatt



általános képletű dialkil-szilil kapcsolócsoportot értünk,

ahol

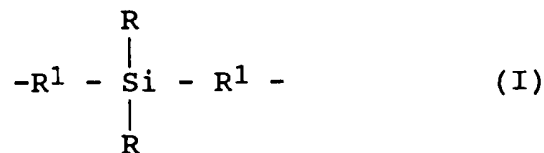
R jelentése egymástól függetlenül 1-6 szénatomos alkilcsoport.



A találmány szerint előnyösen olyan dialkil-szilil kapcsolócsoporthoz építünk ki, amelynek fenti képletében R jelentése izopropilcsoport vagy metilcsoport.

A kiindulási anyagként alkalmazott 3'-szililezett-5'-védett nukleozid a szokásos módon előállítható. Előnyösen úgy járunk el, hogy egy 3'-hidroxil-5'-védett nukleozidot egy bifunkcionális szililező reagenssel reagáltatunk lugos, aprotikus oldatban. Az 5'-szénatomon található hidroxilcsoport blokkolására alkalmazott védőcsoportot a sav stabilizása alapján választjuk ki. Védőcsoportként bármely szokásos védőcsoport alkalmazható, ezen belül előnyös a tritilcsoport, elsősorban monometoxi-tritilcsoport és dimetoxi-tritilcsoport, ahol különösen előnyös a dimetoxi-tritilcsoport (DMT).

A találmány szerinti eljárás során bifunkcionális szililezőszerként előnyösen (I) általános képletű



vegyületet alkalmazunk, a képletben

R jelentése egymástól függetlenül 1-6 szénatomos alkilcsoport,

R¹ jelentése lehasadó csoport.

Előnyösen szimmetrikus (I) általános képletű szililező reagenst alkalmazunk, ahol

R jelentése izopropilcsoport vagy metilcsoport,

R¹ jelentése klóratom vagy -SO₂CF₃ képletű csoport.

A reakcióközegként szolgáló lugos, aprotikus oldatként

előnyösen valamely proton akceptort, így bázist tartalmazó aprotikus oldószert használunk. Ennek során bármely szokásos bázis és oldószer felhasználható, ahol bázisként előnyösen alkalmazhatók a gátolt bázisok, így a 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridin, míg oldószerként előnyösen alkalmazható a dimetil-formamid (DMF) és az acetonitril (CH_3CN) elegye.

A találmány szerinti eljárás során nukleozidként alkalmazhatók oxinukleotidok és dezoxinukleotidok. Az ilyen nukleozidok purin és pirimidin részét az exociklikus aminos csoporton kívánt esetben védjük. Az exociklikus aminos csoport védőcsoportjaként az adenin és citozin esetében előnyösen benzoilcsoportot, míg a guanin esetében előnyösen izobutilcsoportot alkalmazunk. A guanin kívánt esetben az O^6 pozícióban is védhető.

A találmány szerinti eljáráshoz 3'-szililezett nukleozidként alkalmazható valamely nukleozid monomer vagy egy oligonukleotid vagy oligonukleotid analóg 3'-terminális nukleozidja. A találmány szerinti eljárás során az 3' és 5' helyzetben védőcsoport nélküli nukleozidként alkalmazható valamely nukleozid monomer vagy egy oligonukleotid vagy oligonukleotid analóg 5'-terminális nukleozidja, ahol mind a 3'-terminális nukleozid, mind az 5'-terminális nukleozid védőcsoport nélkül áll. Oligonukleotid analóggént tetszőleges típusu internukleozid kötések tartalmazó analógok felhasználhatók.

A találmány szerinti eljárás felhasználható olyan oligonukleotid analógok előállítására, amelyek a nukleozidok

között csak sziloxán kötéseket tartalmaznak. Az ilyen oligonukleotid analógok előállítását módosított folyadékfázisu vagy szilárd fázisu szintézissel (lásd Gait idézett műve) végezzük.

Az előnyös folyadékfázisu eljárásnál egy monomer 3'-szililezett-5'-védett nukleozidot egy első monomer védőcsoport nélküli nukleoziddal reagáltatunk, majd a szililcsoporttal összekapcsolt (3' → 5') és 5' helyzetében védett dinukleozid terméket (nukleozid dimer) egy bifunkcionális szililező reagenssel és egy második védőcsoport nélküli monomer nukleoziddal reagáltatjuk, amikor szililcsoporttal összekapcsolt és 5' helyzetében védett trimert (trinukleozid) kapunk. A lánc meghosszabbításához a fenti lépéseket a kívánt hosszúságu oligonukleotid analóg (nukleozid polimer) előállításáig ismételjük.

Egy alternatív és előnyös változat értelmében a lánc meghosszabbításához az 5'-védett, szililcsoporttal összekapcsolt polimert izoláljuk, az 5' védőcsoportot eltávolítjuk, és a védőcsoport nélküli monomer nukleozid helyett az ilyen, védőcsoport nélküli nukleozid polimert alkalmazzuk. Ennél a megoldásnál a lánc meghosszabbítása sokkal gyorsabb és sztöchiometrikusan hatékonyabb (például trimer + dimer vagy trimer + trimer).

Egy másik előnyös megvalósítási mód szerint a nukleozidok között sziloxán-hiddal összekapcsolt oligonukleotid analógokat módosított, szilárd fázisu szintézissel állítjuk elő, amelynek során a találmány szerinti összekapcsolási

eljárást alkalmazzuk.

A szilárd fázisu szintézis kezdeti lépésében egy 5'-védett nukleozidot kapcsolunk valamely szilárd hordozóanyaghoz, előnyösen szabályos zsugorított üveg (CPG) hordozóhoz. A nukleozidot a CPG hordozóhoz előnyösen egy szukcinát hiddal kapcsoljuk a nukleozid 3'-helyzetű hidroxilcsoportján keresztül. A nukleozidnak a szilárd hordozóhoz történő hozzákapsolásához azonban bármely ismert eljárás felhasználható. A CPG hordozóhoz kapcsolt 5'-védett nukleozid a kereskedelmi forgalomban hozzáférhető.

Az első nukleozidnak a szilárd hordozóhoz történő hozzákapsolását követően a lánc meghosszabbítását a következő lépések sorozatával végezzük:

A megkötött nukleozidról eltávolítjuk az 5'-hidroxilcsoport védőcsoportját, hozzáadjuk az 5'-védett-3'-szililezett nukleozidot és az aktiváló reagenst, majd a reagálatlan láncot blokkoljuk.

A megkötött nukleozid 5'-helyzetű hidroxilcsoportját blokkoló védőcsoportot általában savval, előnyösen triklórecetsavval távolítjuk el.

Az aktiváláshoz a szililezett nukleozid hozzáadását aktiválószerként valamely gátolt bázis jelenlétében végesszük. Az aktiválószerként előnyösen alkalmazható gátolt bázisokra, példaként említhető a 2,6-di-terc-butil-4-metilpiridin. Oldószerként előnyösen alkalmazható az acetonitril és dimetil-formamid elegye. A reagálatlan láncot valamely lezáró reagenssel, így ecetsav-anhidriddel vagy N-metil-



-imidazollal zárjuk le, blokkoljuk.

A kivánt oligonukleotid lánc előállítása után a láncot leválasztjuk a szilárd hordozóról, és a védőcsoportokat a szokásos módon eltávolítjuk (lásd Gaits idézett műve).

A komplett lánc lehasítását a szilárd hordozóról előnyösen vizes ammónia oldattal végezzük izopropanolban és acetónitrilben.

Az ismertetett szilárd fázisu szintézissel tetszőleges hosszúságu, a nukleozidok között sziloxán kötéseket tartalmazó 3',5'-összekötött nukleozid polimerek vagy oligonukleotid analógok állíthatók elő.

Szakember számára nyilvánvaló, hogy bármely más oligonukleotid szintézis módosítható analóg módon a nukleozidok között sziloxán kötéseket tartalmazó oligonukleotid analógok előállítása érdekében. Szakember számára nyilvánvaló továbbá, hogy a találmány szerinti eljárás az ismert eljárásokkal kombinálható, más típusu internukleozid kötéseket vagy sziloxán kötéseket és más kötéseket együttesen tartalmazó oligonukleotidok vagy oligonukleotid analógok előállítása érdekében.

A találmány szerinti eljárás felhasználható tetszőleges oligonukleozid szekvenciák előállításához, amelyek olyan bázisokat tartalmaznak, amelyek a természetes DNS és RNS molekulákban előforduló bázisokat helyettesítve olyan oligonukleotid analógokat képeznek, amelyek a kivánt DNS vagy RNS szegmensekkel hibridizálódnak. Bázisként alkalmazható az adenin (A), citidin (C), guanin (G), uracil (U), timin (T),

valamint ezek módosított származékai, például az 5-bróm- vagy 5-jód-uracil, 5-metil-citozin, izocitozin (2-amino-4-oxo-pirimidin), izoguanin (2-oxo-6-amino-purin), inozin (6-oxo-purin), 5-vinil-uracil és 5-vinil-citozin.

A találmány tárgyát közelebbről az alábbi példákkal világítjuk meg anélkül, hogy az oltalmi kör a példákra korlátozódna.

1. példa

5'-O-Dimetoxi-tritil-3'-O-(5'-dimetil-szilil-3'-O-acetil-timidil)-timidin

4,0 g (7,35 mmól) 5'-O-dimetoxi-tritil-timidin 40 ml CH₂Cl₂-ben és 2,2 ml (16,16 mmól) trietilaminban felvett oldatát lassan 0,948 g (0,89 ml, 7,35 mmól) diklór-dimetil-szilán 100 ml CH₂Cl₂-ben felvett oldatához fecskendezzük -40 °C hőmérsékleten (száraz jég és CH₃CN), majd 3 órán keresztül -40 °C hőmérsékleten kevertetjük. Ezután 1,0 g (3,5 mmól) 3'-O-acetil-timidin és 2,2 ml (16,16 mmól) trietilamin 25 ml CH₂Cl₂-ben felvett oldatát adjuk hozzá, és a reakcióelegyet 3 órán keresztül 0 °C hőmérsékleten kevertetjük. A reakciót 25 ml 5 % vizes NaHCO₃ hozzáadásával lezárjuk. A vizes fázist kétszer 25 ml sóoldattal mossuk, majd nátrium-szulfáton szárítjuk. A nyers terméket (5,3 g) oszlopkromatográfián, szilikagélen etil-acetát/hexán gradienssel tisztítjuk.

Kitermelés: 670 mg (22 %).

$R_f = 0,23$ (EtOAc/hexán 7:3).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 9,02$ (s, 1H, NH), 8,95 (s, 1H, NH), 7,64 (s, 1H), 7,50 (s, 1H), 7,41-7,27 (m, 9H), 6,84 (d, $J=7,7$ Hz, 4H), 6,38 (m, 2H), 5,19 (d, $J=5,6$ Hz, 1H), 4,61 (d, $J=2,5$ Hz, 1H), 4,4 (s, 2H), 3,87 (s, 2H), 3,79 (s, 6H), 3,39 (ABq, $J=10,4$ Hz, $\Delta\gamma = 67,3$ Hz, 2H), 2,41-2,26 (m, 4H), 2,09 (s, 3H), 1,89 (s, 3H), 1,50 (s, 3H), 0,16 (s, 3H), 0,15 (s, 3H).

FABMS (TG/G, 5 % HOAc): $(\text{M}+\text{H})^+ = 884,6$.

2. példa

5'-O-Dimetoxi-tritil-3'-O-(5'-O-diizopropil-szilil-timidil)-timidin

A módszer (gátolt bázis katalízis)

0,5 g (0,92 mmól) 5'-O-dimetoxi-tritil-timidin és 47 mg (0,23 mmól) 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridin 4 ml DMF-ben felvett oldatát 0,2 g (1,0 mmól) 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridin és 0,30 ml (1,0 mmól) diizopropil-szilil-bisz-triflát 5 ml CH_3CN -ben felvett oldatához adagoljuk -40 °C hőmérsékleten. Az elegyet 30 percen keresztül ezen a hőmérsékleten tartjuk, majd hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni. Hozzáadunk 70 mg (1,0 mmól), majd 193 mg (0,8 mmól) védőcsoport nélküli timidint. A reakcióelegyet 1 órán keresztül kevertetjük, majd intenzív kevertetés közben 500 ml jeges



vizhez csepegtetjük. A kapott elegyet 30 percen keresztül kevertetjük, majd szűrjük, a nyers terméket kromatográfiásan tisztítjuk.

Kitermelés: 70 %.

$R_f = 0,45$ (5 % MeOH/EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 9,85$ (s, 2H, NH), 9,44 (s, 1H, NH), 7,64 (s, 1H), 7,41-7,24 (m, 10H), 6,84 (d, $J=7,8$ Hz, 4H), 6,33 (m, 2H), 4,65 (s, 1H), 4,43 (d, $J=2,2$ Hz, 1H), 4,11 (d, $J=2,56$ Hz, 1H), 4,00 (d, $J=3,36$ Hz, 1H), 3,93 (ABq, $J=3,7$ Hz, 11,0 Hz, $\Delta Y = 24,6$, 2H), 3,79 (s, 6H), 3,39 (ABq, $J=3,0$ Hz, 10,8 Hz, $\Delta Y = 49,5$ Hz, 2H), 2,50-2,38 (m, 2H), 2,30-2,07 (m, 2H), 1,88 (s, 3H), 1,56 (s, 3H), 1,05-0,98 (m, 14H).

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

FABMS (TG/G): $(\text{M}+\text{H})^+ = 899$.

Elemanalízis a $\text{C}_{47}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{Si}$ (móltömeg 898) összegképlet alapján:

számolt: C 62,79 % H 6,50 % N 6,23 %;

talált: C 61,83 % H 6,53 % N 6,23 %.



B módszer (nem gátolt bázis katalízis)

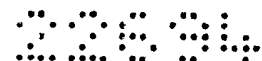
3,54 g (6,65 mmól) 5'-O-dimetoxi-tritil-timidin és 0,88 g (13,3 mmól) imidazol 18 ml DMF-ben felvett oldatát 1,22 g (1,20 ml, 6,62 mmól) diklór-diizopropil-szilán 4,5 ml DMF-ben felvett oldatához csepegtetjük -40 °C hőmérsékleten (száraz jég és CH₃CN). A reakcióelegyet 1 órán keresztül -40 °C hőmérsékleten kevertetjük, majd 1,61 g (6,65 mmól) védőcsoport nélküli timidin és 0,9 g (1,33 mmól) imidazol 15 ml DMF-ben felvett oldatát csepegtetjük hozzá. A reakcióelegyet 1 órán keresztül -40 °C hőmérsékleten kevertetjük, majd egy éjszaka alatt hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni. A reakcióelegyet ezután intenzív kevertetés közben 1 liter jeges vízhez csepegtetjük, majd 30 percen keresztül kevertetjük. Az elegyet szűrjük, a fehér csapadékot levegőn szárítjuk, és szilikagélen 60-100 % EtOAc/hexán gradienssel kromatografáljuk.

Kitermelés: 1,47 g (25 %).

3. példa

N⁶-Benzoil-2'-dezoxi-5'-O-dimetoxi-tritil-3'-O-(5'-diizopropil-szilil-timidil)-adenozin

3,28 g (5 mmól) N⁶-benzoil-2'-dezoxi-5'-O-dimetoxi-tritil-adenozin és 0,68 g (10 mmól) imidazol 15 ml DMF-ben felvett oldatát lassan 0,9 ml (5 mmól) diklór-diizopropil-szilán 1,5 ml DMF-ben felvett oldatához csepegtetjük -40 °C hőmérsékleten (száraz jég és CH₃CN). A reakcióelegyet



1 órán keresztül $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten kevertetjük, majd 1,81 g (7,5 mmól) timidin és 0,51 g (7,5 mmól) imidazol 20 ml DMF-ben felvett oldatát csepegtetjük hozzá. A reakcióelegyet 1 órán keresztül $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten kevertetjük, majd egy éjszaka alatt hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni. Ezután intenzív kevertetés közben egy liter jeges vízhez csepegtetjük, és 30 percen keresztül kevertetjük. A csapadékot szűrjük, és szárítjuk. A kapott fehér, szilárd anyagot (5,8 g) preparatív vékonyrétegekromatográfián (1 mm SiO_2 , 3 % MeOH/EtOAc) tisztítjuk.

Kitermelés: 50 mg, 38 %.

$R_f = 0,32$ (2 % MeOH/EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 9,99$ (s, 1H, NH), 8,76 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,09 (d, $J=7,8$ Hz, 2H), 7,55-7,13 (m, 13H), 6,74 (m, 4H), 6,42 (t, $J=5,8$ Hz, 1H), 6,25 (t, $J=6,0$ Hz, 1H), 4,96 (d, $J=5,4$ Hz, 1H), 4,48 (s, 1H), 4,19 (d, $J=3,8$ Hz, 1H), 3,94 (s, 1H), 3,83-3,72 (m, 2H), 3,72 (s, 6H), 3,38 (d, $J=3,4$ Hz, 2H), 2,83-2,76 (m, 1H), 2,60-2,52 (m, 1H), 2,45-2,38 (m, 1H), 2,05-1,95 (m, 1H), 1,79 (s, 3H), 0,95 (m, 14H).

FABMS (TG/G): $(\text{M-H})^- = 1011$.

4. példa

**N⁴-Benzoil-2'-dezoxi-5'-O-dimetoxi-tritil-3'-O-(5'-
-O-diizopropil-szilil-timidil)-citidin**

A cím szerinti vegyületet a 3. példában leírt módon állítjuk elő. A nyers terméket preparatív vékonyréteg kromatográfiásan (1 mm SiO₂, 3 % MeOH/EtOAc) tisztítjuk.

Becsült kitermelés: 70 %.

R_f = 0,40 (2 % MeOH/EtOAc).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 9,54 (s, 1H), NH), 8,21 (d, J=7,6 Hz, 1H), 7,94 (d, J=8,2 Hz, 2H), 7,59-7,24 (m, 14H), 6,83 (d, J=8,4 Hz, 4H), 6,25 (m, 2H), 4,58 (s, 1H), 4,46 (s, 1H), 4,17 (s, 1H), 4,07-3,80 (m, 3H), 3,77 (s, 6H), 3,39 (ABq, J=3,0 Hz, 10,9 Hz, Δν = 29,1 Hz, 2H), 2,84-2,78 (m, 1H), 2,46-2,41 (m, 1H), 2,14-1,79 (m, 2H), 1,84 (s, 3H), 0,98 (m, 14H).

FABMS (NBA): (M-H)⁻ = 987.

5. példa

**3'-Szililezett-N⁴-benzoil-2'-dezoxi-5'-O-dimetoxi-
-tritil-citidin**

A módszer

260 mg (0,4 mmól) N⁴-benzoil-2'-dezoxi-5'-O-dimetoxi-tritil-citidin és 52 mg (0,8 mmól) imidazol 1,6 ml CH₃CN-ben felvett oldatát lassan 72 μl (0,4 mmól) diklór-diizo-



propil-szilán 0,4 ml CH₃CN-ben felvett oldatához csepegtetjük -40 °C hőmérsékleten (száraz jég és CH₃CN). A reakcióelegyet 30 percen keresztül -40 °C hőmérsékleten, majd 30 percen keresztül szobahőmérsékleten kevertetjük. A reakcióelegyet szűrjük, a terméket (3'-O-szililezett citidin) oszlopkromatográfiásan szilikagélen 60 % EtOAc/hexán - 100 % EtOAc - 1 % MeOH/EtOAc gradienssel tisztítjuk.

Kitermelés: 100 mg (28 %).

R_f = 0,71 (0,5 % MeOH/EtOAc).

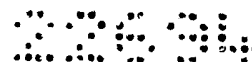
Izolálható továbbá 50 mg 3',3'-szimmetrikus C-C dimer.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8,43 (d, J=7,6 Hz, 1H),
7,88 (d, J=8,2 Hz, 2H), 7,60-7,26 (m, 13H), 6,87
(d, J=8,4 Hz, 4H), 6,25 (t, J=6,5 Hz, 1H), 4,71 (m,
1H), 4,10 (m, 1H), 3,80 (s, 6H), 3,48 (ABq, J=3 Hz,
11 Hz, Δγ=30 Hz, 2H), 2,67 (m, 1H), 2,35 (m, 1H),
0,97 (m, 14H).

FABMS (TG/G): (M+H)⁺ = 884,6.

B módszer

A 3',3'-szimmetrikus dimer mennyiségének csökkentése érdekében 2,0 g (3,08 mmól) N⁴-benzoil-2'-dezoxi-5'-O-dimetoxi-tritil-citidin 5 ml DMF és 2 ml CH₃CN elegyében felvett oldatát -40 °C hőmérsékleten (száraz jég és CH₃CN) 1,0 ml (3,38 mmól) diizopropil-szilil-bisz-triflát és 700 mg (3,38 mmól) 2,6-di-terc-butyl-4-metil-piridin 8 ml CH₃CN-ben felvett oldatához csepegtetjük. A reakcióelegyet 30 percen keresztül -40 °C hőmérsékleten kevertetjük, majd a terméket



vékonyrétegkromatográfiásan tisztítjuk.

6. példa

5'-O-Dimetoxi-tritil-3'-O-(5'-O-diizopropil-szilil-timidil)-timidin detritilezése

200 mg (22 mmól) cím szerinti vegyület 4 ml CH_2Cl_2 -ben felvett oldatát 6 ml, CH_2Cl_2 -ben felvett, 3 %-os triklór-ecetsav oldathoz adagoljuk. A halvány narancssárga színű oldatot 10 percen keresztül szobahőmérsékleten kevertetjük, majd 5 ml 5 % vizes NaHCO_3 -hoz öntjük, és 5 % MeOH/EtOAc elegyével extraháljuk. A szerves fázist 10 ml sóoldattal mossuk, nátrium-szulfáton szárítjuk, és a nyers terméket oszlopkromatográfiásan szilikagélen EtOAc/hexán 60:40 - 10 % MeOH/EtOAc gradienssel tisztítjuk.

Kitermelés: 90 mg (70 %).

$R_f = 0,40$ (10 % MeOH/EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): $\delta = 7,54$ (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 6,03 (m, 2H), 4,46 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 3,82-3,69 (m, 3H), 3,50 (m, 4H), 2,06-1,97 (m, 4H), 1,62 (s, 6H), 0,85 (m, 14H).

FABMS (TG/G): $(\text{M}+\text{H})^+ = 597,3$.



7. példa

5'-O-Dimetoxi-tritil-3'-O-[5'-O-diizopropil-szilil-timidil-3'-O-(5'-O-diizopropil-szilil-tiidil)]-timidin
**Chem. Abstr. Index név: timidin, 5'-O-[bisz(1-metil-
-etil)-szililén]-5'-O-defoszfinoko-timidili-(5' → 3')-
-5'-O-[bisz(1-metil-etil)-szililén]-5'-O-defoszfinoko-
-timidilil-(5' → 3')-5'-O-[bisz(4-metoxi-fenil)-fenil-
-metil]-**

A módszer

8,0 g (14,7 mmól) 5'-O-dimetoxi-tritil-timidin és 2,0 g (29,94 mmól) imidazol 40 ml DMF-ben felvett oldatát lassan 2,72 g (2,64 ml, 14,7 mmól) diklór-diizopropil-szilán 10 ml DMF-ben felvett oldatához csepegtetjük -40 °C hőmérsékleten (száraz jég és CH₃CN). A reakcióelegyet 1 órán keresztül -40 °C hőmérsékleten kevertetjük, majd 3,56 g (14,7 mmól) timidin és 2,0 g (29,4 mmól) imidazol 40 ml DMF-ben felvett oldatát csepegtetjük hozzá. A reakcióelegyet 1 órán keresztül -40 °C hőmérsékleten kevertetjük, majd nitrogén atmoszféra alatt 2,72 g (2,64 ml, 14,7 mmól) 10 ml DMF-ben felvett oldatához csepegtetjük -40 °C hőmérsékleten. A reakcióelegyet 1 órán keresztül -40 °C hőmérsékleten kevertetjük. Ezután 3,56 g (14,7 mmól) timidin és 2,0 g (29,4 mmól) imidazol 40 ml DMF-ben felvett oldatát adjuk hozzá, és 1 órán keresztül -40 °C hőmérsékleten kevertetjük. A kapott elegyet intenzív kevertetés közben 2 liter jeges vízre csepegtetjük, majd 30 percen keresztül kevertetjük. A csapadékot szűrjük,



és levegőn szárítjuk. A fehér szilárd anyagot (27 g) 150 g szilikagélen 60-100 % EtOAc/hexán gradienssel oszlopkromatográfiásan tisztítjuk.

Kitermelés: 1,8 g (10 %).

B módszer

1,0 g (1,11 mmól) 5'-O-dimetoxi-tritil-3'-O-(5'-O-diizopropil-szilil-timidil)-timidin és 60 mg (0,28 mmól) 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridin 3 ml DMF-ben felvett oldatát 0,504 g (0,360 ml, 1,22 mmól) diizopropil-szilil-bisz-triflát és 0,25 g (1,22 mmól) 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridin 3 ml CH₃CN-ben felvett oldatához csepegtetjük -40 °C hőmérsékleten (száraz jég és CH₃CN). A reakcióelegyet 1 órán keresztül -40 °C hőmérsékleten kevertetjük, majd 0,16 g (1,22 mmól) imidazol 2,5 ml CH₃CN-ben felvett oldatát adjuk hozzá, és a reakcióelegyet szobahőmérsékletre melegítjük. 0,269 g (1,11 mmól) timidin 2 ml DMF-ben felvett oldatát adjuk hozzá, és 1 órán keresztül kevertetjük, majd intenzív kevertetés közben 1 liter jeges vízre csepegtetjük. 30 perccen keresztül kevertetjük, majd a csapadékot szűrjük, és levegőn szárítjuk. A kapott fehér szilárd anyagot (1,5 g) 20 ml hexánnal elkeverjük.

Kitermelés: 1,05 g (76 %).

R_f = 0,38 (5 % MeOH/EtOAc).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7,62 (s, 1H), 7,36-7,22 (m, 11H), 6,80 (d, J=7,7 Hz, 4H), 6,36-6,22 (m, 3H), 4,62-4,54 (m, 2H), 4,45 (m, 1H), 4,06-3,83 (m, 7H),



3,75 (s, 6H), 3,36 (ABq, J=10 Hz, $\Delta\nu$ = 47,6 Hz, 2H),
2,45-2,30 (m, 3H), 2,28-2,14 (m, 1H), 2,13-2,00 (m,
2H), 1,85 (s, 3H), 1,81 (s, 3H), 1,48 (s, 3H), 0,98
(m, 28H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ = 164,54, 164,45, 164,33, 159,00
151,12, 150,99, 144,40, 135,73, 135,51, 135,40,
130,15, 128,16, 113,37, 111,54, 111,32, 111,07,
87,50, 87,02, 85,23, 85,02, 73,35, 72,98, 71,24,
63,28, 63,02, 55,15, 41,33, 40,64, 40,25, 17,04,
17,00, 16,92, 12,26, 11,70, 11,59, 11,53, 11,47.

FABMS (TG/G): $(\text{M}+\text{H})^+ = 1252,5$.

Elemanalízis a $\text{C}_{63}\text{H}_{84}\text{N}_6\text{O}_{17}\text{SI}_2$ (móltömeg 1253,6) összeg-
képlet alapján:

számolt: C 60,38 %, H 6,71 %, N 6,71 %;

talált: C 60,44 %, H 6,84 %, N 6,56 %.

8. példa

5'-O-Dimetoxi-tritil-trimer detrililezése

0,80 g (0,638 mmól) 5'-O-dimetoxi-tritil-trimer 12 ml
 CH_2Cl_2 -ben felvett oldatát 14 ml 3 térfogat%-os triklór-
-ecetsav/ CH_2Cl_2 elegyhez adjuk. A halvány narancssárga
oldatot 1 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertetjük,
majd 15 ml 5 % vizes NaHCO_3 -ra öntjük, és 5 % MeOH/EtOAc
eleggyel extraháljuk. A szerves fázist 20 ml sóoldattal
mossuk, és nátrium-szulfáton szárítjuk. A terméket szilika-
gélén 100-95 % EtOAc/MeOH gradienssel oszlopkromatográfián



sóoldattal mossuk, és nátrium-szulfáton szárítjuk. A terméket preparatív reverz fázisu HPLC segítségével (Ultrasphere ODS, 20 % 0,01 móll/l trietil-ammónium-acetát, pH = 7,5, 80 % CH₃CN) tisztítjuk.

Kitermelés: 10 mg (31 %).

R_f = 0,16 (5 % MeOH/EtOAc).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7,65 (s, 1H), 7,39-7,26 (m, 12H), 6,85 (d, J=7,7 Hz, 4H), 6,38-6,27 (m, 4H), 4,66-4,45 (m, 4H), 4,10-3,85 (m, 10H), 3,80 (s, 6H), 3,39 (ABq, J=11 Hz, Δν=45 Hz, 2H), 2,45-2,08 (m, 8H), 1,92 (s, 3H), 1,90 (s, 3H), 1,87 (s, 3H), 1,56 (s, 3H), 1,03 (m, 42H).

FABMS (TG/G): (M+H)⁺ = 1608,3.

(M+Na)⁺ = 1630,0.

10. példa

Szilil-hidakat tartalmazó pentatimidil nukleotid analóg

73 mg (58,4 μmól) 5'-dimetoxi-tritil-trimer és 6 mg (29,2 μmól) 2,6-di-terc-butyl-4-metil-piridin 600 μl DMF-ben felvett oldatát lassan 17,5 μl (58,4 μmól) diizopropil-szilil-bisz-triflát és 12 mg (58,4 μmól) 2,6-di-terc-butyl-4-metil-piridin 300 μl DMF-ben felvett oldatához csepegtetjük egy hűtött, 5 ml-es gömblombikban -40 °C hőmérsékleten (száraz jég és CH₃CN). A reakcióelegyet 1 órán keresztül kevertetjük, majd 50,6 mg (55,5 μmól) detritilezett dimer és 6,75 mg (100 μmól) imidazol 300 μl DMF-ben felvett oldatát

adjuk hozzá. A reakcióelegyet 1 órán keresztül $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten kevertetjük, majd szobahőmérsékletre melegítjük. 2 ml 5 % vizes NaHCO_3 oldatot adunk hozzá, kétszer 10 ml CHCl_3 -mal extraháljuk, 2 ml sóoldattal mossuk, és nátrium-szulfáton szárítjuk.

FABMS (TG/G): $(\text{M}+\text{H})^+ = 1961$.

Fragmens ionok: 1900, 1607, 1252, 898 és 544.

FABMS (NBA): $(\text{M}-\text{H})^- = 1961$.

11. példa

Timidin-dekanukleotid szilárd fázisu szintézise

A. Monomer szintézis egység előállítása

0,60 ml (2 mmól) diizopropil-szilil-bisz-triflátot csepegtetünk 0,41 g (2 mmól) 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridin 5 ml CH_3CN -ben felvett oldatához egy 100 ml-es gömblombikban nitrogén atmoszféra alatt. A tiszta oldatot $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletre (száraz jég és CH_3CN) hűtjük, és 1,0 g (1,84 mmól) 5'-O-dimetoxi-tritil-timidin és 94 mg (0,46 mmól) 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridin 5 ml DMF-ben felvett oldatát csepegtetjük hozzá 10 perc alatt. A reakcióelegyet 1 órán keresztül $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten kevertetjük, majd 250 mg (3,7 mmól) imidazol 4 ml DMF-ben felvett oldatát adjuk hozzá, végül 5 ml CH_3CN -nel 0,1 mól/l végső koncentrációra higitjuk.



B. A dekanukleotid előállítása

Az elegyet szobahőmérsékletre melegítjük, majd szilárd fázisu automatikus szintetizátorban dekanukleotidot állítunk elő.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OH): $\delta = 7,55-7,47$ (m, 10H),
6,23-6,33 (m, 10H), 4,69 (s, br, 9H), 4,40 (s, br,
1H), 4,10-3,40 (m, 19H), 3,25-3,08 (m, 1H), 2,55-
-2,20 (m, 20H), 1,87 (s, br, 27H), 1,30 (s, br,
3H), 1,08 (m, 126H).

FABMS (TG/G): $(\text{M-H})^- = 3434,2$;

$(\text{M+H})^+ = 3433,7$.

FABMS (NBA): $(\text{M-H})^- = 3435,2$.

Képlet: $\text{C}_{154}\text{H}_{248}\text{N}_{20}\text{O}_{50}$; móltömeg: 3432,5.

12. példa

**5'-O-Dimetoxi-tritil-3'-O-(5'-O-dimetoxi-tritil-3'-
-O-(5'-O-diizopropil-szilil-timidil)-timidin-3'-N,N-
-diizopropil-(2-ciano-etil)-foszforamidit**

90 mg (0,1 mmól) 5'-O-dimetoxi-tritil-dimert 6 ml tetrahidrofurán/piridin 2:1 elegyből kétszer bepárlunk, majd 500 μl THF-ben oldjuk, és kevertetés közben 4 mg 4-dimetil-amino-piridin, 87 μl (0,4 mmól) CaH_2 -ből desztillált diizopropil-etil-amin és 28,77 μl (0,15 mmól) 2-ciano-etil-N,N-diizopropil-klór-foszforamidit 500 μl THF-ben felvett oldatához csepegtetjük nitrogén atmoszférában szobahőmér-

sékleten. A reakcióelegyet 2 órán keresztül kevertetjük, majd a nyomnyi 5'-O-dimetoxi-tritil-3'-O-(5'-O-diizopropil-szilil-timidil)-timidin eltávolítása érdekében további 5 μ l (0,025 mmól) 2-ciano-etil-N,N-diizopropil-klór-fosforamiditet adunk hozzá. A reakcióelegyet 1 órán keresztül kevertetjük, 10 ml EtOAc-t (5 ml sóoldattal előre mosva) adunk hozzá, kétszer 2 ml sóoldattal mossuk, és nátrium-szulfáton szárítjuk. A nyers terméket oszlopkromatográfián szilikagélen EtOAc/hexán 1:1 eleggyel tisztítjuk.

Kitermelés: 82 mg (74,5 %).

R_f = 0,70 (1 % MeOH/EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8,96 (s, br, 1H),
 7,64 (s, 1H), 7,40-7,22 (m, 10H), 6,84 (d, $J=8,8$ Hz, 4H), 6,40 (t, $J=6,5$ Hz, 1H), 6,27 (t, $J=6,5$ Hz, 1H), 4,67 (m, 1H), 4,53 (m, 1H), 4,10 (m, 2H), 3,93 (m, 1H), 3,87 (m, 1H), 3,80 (s, 6H), 3,61 (m, 2H), 3,39 (ABq, $J=4$ Hz, 10 Hz, $\Delta\gamma=42$ Hz, 2H), 2,64 (m, 2H), 2,53-2,05 (m, 4H), 1,86 (s, 3H), 1,51 (s, 3H), 1,26 (m, 2H), 1,17 (m, 12H), 1,01 (m, 14H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 163,58, 163,44, 158,72, 150,14, 144,18, 135,47, 135,25, 129,99, 127,99, 127,16, 117,58, 113,26, 111,16, 111,02, 110,94, 86,96, 86,23, 85,82, 85,74, 84,90, 84,74, 84,64, 73,41, 73,22, 63,40, 62,89, 62,70, 58,25, 58,17, 57,98, 57,87, 55,23, 43,36, 43,17, 41,47, 39,69, 39,47, 24,52, 24,44, 22,96, 20,42, 20,32, 17,24,



17,05, 12,44, 11,92, 11,71, 11,57.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , referencia H_3PO_4): $\delta = 149,16$.

IR (KBr): 3192, 3058, 2965, 2932, 2868, 2838, 2246,
1693, 1608, 1510, 1465, 1398, 1382, 1365, 1322,
1289, 1274, 1251, 1199, 1179, 1158, 1129, 1084,
1064, 1035, 1003, 978, 913, 885, 828, 812, 794,
773, 756, 727, 702 cm^{-1} .

FABMS (NBA): $(\text{M}+\text{H})^+ = 1099$.

Elemanalízis a $\text{C}_{56}\text{H}_{75}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{P}$ Si (móltömeg 1100) összeg-
képlet alapján:

számolt: C 61,19 %, H 6,88 %, N 7,64 %;

talált: C 60,60 %, H 6,87 %, N 7,60 %.

13. példa

**5'-O-Dimetoxi-tritil-3'-O-[5'-O-diizopropil-szilil-
-timidil-3'-O-(5'-O-diizopropil-szilil-timidil)-timi-
din-3'-N,N-diizopropil-(2-ciano-etil)-foszforamidit
(trimer)**

550 mg (0,44 mmól) 5'-dimetoxi-tritil-trimert 20 ml THF
és 10 ml piridin elegyéből kétszer bepárlunk, majd 2 ml
 CH_2Cl_2 -ben oldjuk, és 20 mg 4-dimetil-amino-piridin,
370 μl (1,69 mmól) CaH_2 -ből desztillált diizopropil-etilamin
és 120 μl (0,64 mmól) 2-ciano-etil-N,N-diizopropil-klór-
-foszforamidit 2,0 ml CH_2Cl_2 -ben felvett oldatához
csepegtetjük kevertetés közben nitrogén atmoszférában 0 °C
hőmérsékleten. A reakcióelegyet szobahőmérsékletre mele-



gitjük, 1 órán keresztül kevertetjük, 50 ml EtOAc-ba (25 ml sóoldattal előre mosva) öntjük, kétszer 20 ml sóoldattal mossuk, és nátrium-szulfáton szárítjuk. A nyers terméket oszlopkromatográfiásan (10 g szilikagél, EtOAc) tisztítjuk.

Kitermelés: 320 mg (64 %).

$R_f = 0,76$ (EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,63$ (s, 1H), 7,41-7,22 (m, 11H), 6,83 (d, $J=7,8$ Hz, 4H), 6,40-6,24 (m, 3H), 4,67-4,54 (m, 3H), 4,13-3,85 (m, 7H), 3,75 (s, 6H), 3,55 (m, 2H), 3,48-3,28 (m, 2H), 2,74 (t, $J=6$ Hz, 2H), 2,45-2,03 (m, 6H), 1,88 (s, 3H), 1,83 (s, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,28-1,13 (m, 14H), 1,00 (m, 28H).

FABMS (NBA): $(\text{M-H})^- = 1453$.

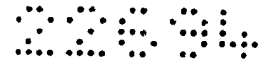
14. példa

5'-O-Dimetoxi-tritil-3'-O-(3'-O-dimetoxi-tritil-timidil)-timidin (3',3'-dimer)

A 3',5'-timidin-timidin-dimer 14. példa szerinti szililezése során fő melléktermékként 3',3'-dimer keletkezik. A cím szerinti vegyületet a nyers reakciótermékből (800 mg) oszlopkromatográfiásan (szilikagél, 60-90 % EtOAc/hexán) izoláljuk.

$R_f = 0,41$ (60 % EtOAc/hexán).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 9,95$ (s, br, 1H, NH), 8,63 (s, br, 1H, NH), 7,51 (s, 2H), 7,35-7,15 (m, 18H), 6,77 (d, $J=8,7$ Hz, 8H), 6,34 (m, 2H), 4,57



(d, $J=4,3$ Hz, 2H), 3,91 (s, 2H), 3,71 (s, 12H), 3,24
(ABq, $J=2,8$ Hz, 10,7 Hz, $\Delta\nu=54$ Hz, 4H), 2,46 (m,
2H), 2,26 (m, 2H), 1,46 (s, 6H), 0,88 (m, 14H).

FABMS (NBA): $(M-H)^- = 1200,1$.

15. példa

**N⁶-Benzoil-2'-dezoxi-5'-O-dimetoxi-tritil-3'-O-
-(3'-O-diizopropil-szilil-N⁶-benzoil-2'-dezoxi-
-5'-O-dimetoxi-tritil-adenozil)-adenozin**

A 3',3'-adenozin-timidin-dimer előállításánál a szililezési lépés fő melléktermékeként 3',3'-dimer keletkezik. A nyers termék (100 mg) egy részét preparatív vékonyrétegekromatográfián (1 mm SiO₂, 3 % MeOH/EtOAc) tisztítva tiszta végterméket kapunk.

$R_f = 0,45$ (90 % EtOAc/hexán).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,60$ (s, 2H), 8,14
(s, 2H), 8,00 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7,62 (s, 2H), 7,57-
-7,04 (m, 22H), 6,73 (d, $J=9$ Hz, 8H), 6,38 (m,
2H), 4,79 (m, 2H), 4,14 (m, 2H), 3,68 (s, 12H),
3,52-3,24 (m, 4H), 2,86 (m, 2H), 2,51 (m, 2H),
0,98 (m, 14H).

FABMS (NBA): $(M+H)^+ = 1428,3$;

$(M-H)^- = 1426,4$.



16. példa

**N⁴-Benzoil-2'-dezoxi-5'-O-dimetoxi-tritil-3'-
-O-(3'-O-diizopropil-szilil-N⁴-benzoil-2'-dezoxi-
-5'-O-dimetoxi-tritil-citidil)-citidin**

Az N⁴-benzoil-2'-dezoxi-5'-O-dimetoxi-tritil-citidin 15. példa szerinti szililezése során fő melléktermékként 3',3'-dimer keletkezik. Ezt a dimert a nyers reakcióelegyből oszlopkromatográfián (szilikagél, 60-100 % EtOAc/hexán - 1 % EtOAc/MeOH gradiens) tisztítva cím szerinti vegyületet kapunk.

$R_f = 0,31$ (1 % MeOH/EtOAc).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,82$ (s, br, 1H, NH),
8,28 (d, J=8 Hz, 1H), 8,25 (d, J=8 Hz, 1H), 7,89 (m,
4H), 7,63-7,24 (m, 26H), 6,85 (m, 8H), 6,23 (m, 2H),
4,57 (m, 2H), 4,20 (m, 2H), 3,80 (s, 12H), 3,50-3,23
(m, 4H), 2,60 (m, 2H), 2,15 (m, 2H), 0,96 (m, 14H).

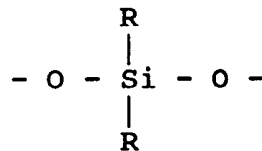
FABMS (NBA): (M+H)⁺ = 1379,2;

(M-H)⁻ = 1378,2.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás nukleozidok sziloxán-hiddal történő összekapcsolására, azzal jellemezve, hogy egy 3'-szililezett-5'-védett nukleozidot védőcsoport nélküli nukleoziddal reagáltatunk bázis katalízis jelenlétében.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy



általános képletű sziloxán-hidat alakítunk ki, a képletben R jelentése egymástól függetlenül 1-6 szénatomos alkilcsoport.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a képletben

R jelentése izopropilcsoport vagy metilcsoport.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy további lépésként

- a) egy 5'-védett nukleozidot egy bifunkcionális szililező reagenssel szililezünk,
- b) a szililezett nukleozidot védőcsoport nélküli nukleoziddal reagáltatjuk bázis katalízis jelenlétében, és
- c) az a) és b) lépéseket ismételve oligonukleotid analógot állítunk elő.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy szililezett nukleozidként és védő-

csoport nélküli nukleozidként monomer nukleozidot alkalmazunk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy monomer nukleozidként timidint, N⁶-benzoil-dezoxi-adenozint, N⁴-benzoil-dezoxi-citidint és/vagy N²-izobutil-dezoxi-guanozint alkalmazunk.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy szililezett nukleozidként az oligonukleotid vagy oligonukleotid analóg 3'-terminális nukleozidját alkalmazzuk.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy védőcsoport nélküli nukleozidként egy oligonukleotid vagy oligonukleotid analóg 5'-terminális nukleozidját alkalmazzuk, ahol a 3'- és 5'-terminális nukleozidok védőcsoport nélkül állnak.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a reakciót aprotikus oldószerben hajtjuk végre.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a reakciót semleges vagy lugos aprotikus oldószerben hajtjuk végre.

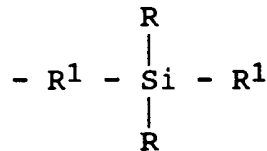
11. A 9. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy aprotikus oldószerként 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridin acetonitril és dimetil-formamid elegyében felvett oldatát alkalmazzuk.

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy sztérikusan gátolt bázikus katalizist

alkalmazunk.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy bázikus katalizátorként 2,6-di-terc-butil-4-metil-piridint alkalmazunk.

14. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy bifunkcionális szililező reagensként (I) általános képletű



vegyületet alkalmazunk, a képletben

R jelentése egymástól függetlenül 1-6 szénatomos alkilcsoport,

R¹ jelentése egymástól függetlenül lehasadó csoport.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy R¹ jelentése klóratom vagy -SO₂CF₃ képletű csoport.

16. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy R jelentése egymástól függetlenül izopropilcsoport vagy metilcsoport.

A meghatalmazott:

M. J. ...
[Signature]

DANUBIA
 Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
 10.
[Signature]