

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) FI 930455 A7

(12) JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **930455**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07H 21/00
C07H 19/04

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **02.08.1991**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.02.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **24.03.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **02.08.1991** **PCT/US1991/005531**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

03.08.1990	US	562180	13.09.1990	US	582287
13.09.1990	US	582456	13.09.1990	US	582457
09.04.1991	US	682784			

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Sanofi, 32/34 rue Marbeuf 75008 Paris, France, RANSKA, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Weis, Alexander Ludvik, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • Hausheer, Frederick Herman, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • Chaturvedula, Prasad Venkata Chala, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • Delecki, Daniel Joseph, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 • Cavanaugh, Jr., Paul Francis, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
6 • Moskwa, Patricia Susan, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
7 • Oakes, Fred Terry, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Yhdisteitä ja menetelmiä geeniekspression inhiboimiseksi

Föreningar och förfaranden för inhibering av gen expression

Yhdisteitä ja menetelmiä geeniekspression inhiboimiseksi

Kuvaus

Ristiviittaus tähän liittyviin patenttihakemuksiin

5 Tämä patenttihakemus on jatkohakemus US-patenttihakemukselle nro 07/562 180, jätetty 3. elokuuta 1990; US-patenttihakemukselle 07/582 287, jätetty 13. syyskuuta 1990; US-patenttihakemukselle 07/582 456, jätetty 13. syyskuuta 1990; ja US-patenttihakemukselle 07/582 457, 10 jätetty 13. syyskuuta 1990.

Tekninen ala

Tämä keksintö koskee yhdisteitä, koostumuksia ja menetelmiä, joilla voidaan inhiboida geeniekspressiota. Tämän keksinnön yhdisteet sisältävät 1) oligonukleosidisekvenssejä, pituudeltaan noin 6 - noin 200 emästä, joissa 15 on kolmiatominen nukleosidien välinen sidos ja 2) oligonukleotidisekvenssejä, pituudeltaan noin 9 - noin 200 emästä, joissa on dioli jommassa kummassa päässä tai molemmissa päissä.

20 Keksinnön tausta

"Antisense"-yhdiste on yhdiste, joka sitoutuu nukleotidisekvenssiin nukleiinihapossa, RNA:ssa tai DNA:ssa, tai hybridisoituu sen kanssa, inhiboidakseen mainitun nukleiinihapon toimintaa tai synteesiä. Koska "antisense"-yhdisteet kykenevät hybridisoitumaan sekä RNA:n että DNA:n kanssa, ne voivat häiritä geeniekspressiota transkripti- 25 on, RNA:n muokkauksen tai translaation tasolla.

"Antisense"-molekyylejä voidaan suunnitella ja syntetoida niin, että spesifisten geenien transkriptio RNA:ksi estetään siten, että hybridisoidaan genomiseen DNA:han ja estetään RNA-polymeraasin toiminta suoraan tai epäsuorasti. DNA:han kohdistamisen etu on se, että terapeuttisen vaikutuksen aikaansaamiseksi tarvitaan vain pie- 30 niä määriä "antisense"-yhdisteitä. Vaihtoehtoisesti "antisense"-yhdisteitä voidaan suunnitella ja syntetisoida si-

ten, että ne hybridisoituvat RNA:n kanssa inhiboidakseen transkription jälkeistä muokkausta (RNA:n muokkaus) tai proteiinisynteesin (translaatio) mekanismeja. Esimerkkejä kohde-RNA:ista ovat lähetti-RNA (mRNA), siirtäjä-RNA (tRNA), ribosomaalinen RNA (rRNA) ja vastaavat. Esimerkkeihin muokkaus- ja translaatiomekanismeista kuuluvat esiaste-RNA:n silmukointi intronien poistamiseksi, cap-rakenteiden lisäys mRNA:n 5'-päähän, hybridisaatiopysäytys ja nukleaasivälitteinen mRNA:n hydrolyysi.

10 Tällä hetkellä "antisense"-tekniikoiden käytännön tieteellisten ja terapeuttisten sovellusten kehittämistä haittaavat kuitenkin monet tekniset ongelmat. Klausner, A., Biotechnology, 8:303-304 (1990). Synteettiset "antisense"-molekyylit ovat alttiita nopealle hajoamiselle, 15 jonka aiheuttavat kohdesoluissa olevat nukleaasit. "Antisense"-DNA:n tai RNA:n oligonukleotidisekvenssejä tuhoavat esimerkiksi eksonukleaasit, jotka vaikuttavat joko nukleiinihapon 5'- tai 3'-päähän. Lisäksi endonukleaasit voivat katkaista DNA:n tai RNA:n yksittäisten nukleosidien välisten sisäisten fosforiesterisidosten kohdalta. Sellaisen 20 katkaisun tuloksena annettujen "antisense"-yhdisteiden todellinen puoliintumisaika on hyvin lyhyt, mikä tekee välttämättömäksi sen, että käytetään suuria, säännöllisesti annettuja annoksia.

25 Toinen ongelma on "antisense"-DNA:n tai RNA:n tuottamisen äärimmäisen korkeat kustannukset silloin, kun käytetään saatavilla olevia puoliautomaattisia DNA-syntetisaattoreita. Hiljattain on arvioitu, että yhden "antisense"-DNA-gramman tuottokustannukset ovat noin 100 000 dollaria. Armstrong, L., Business Week, March 5, 1990, sivu 30 89.

35 Vielä toinen ongelma koskee "antisense"-agenssien viemistä haluttuihin kohteisiin elimistön ja solun sisällä. Genomiseen DNA:han kohdistettujen "antisense"-DNA-molekyylien täytyy päästä tumaan (eli agenssien täytyy lä-

päistä solukalvo ja tumamembraani). Lisääntyneen membraanin läpäisykyvyn (lisääntyneen hydrofobisuuden) tarve täytyy kuitenkin tasapainottaa vesiliukoisuuden (lisääntyneen hydrofiilisyyden) tarpeen kanssa elimistön nestetiloissa kuten plasma ja sytosoli.

Vielä toinen ongelma koskee "antisense"-agenssien stabiiliutta, olivat ne sitten vapaina elimistössä tai hybridisoituneina kohdenukleiinihappoihin. Oligonukleotidisekvenssit, kuten "antisense"-DNA, ovat alttiita steeriselle konfiguraation muutokselle kiraalisten fosforikeskusten ympärillä.

Geenikohdistus "antisense"-agenssien välityksellä on väistämätön seuraava vaihe ihmisterapiassa. Armstrong, yllä, sivulla 88. "Antisense"-teknologian menestyksekkäs soveltaminen sairauden hoitoon vaatii kuitenkin, että yllä esitettyihin ongelmiin löydetään ratkaisut.

Yksi lähestymistapa, jolla voidaan valmistaa "antisense"-yhdisteitä, jotka ovat stabiileja, nukleasiresistenttejä, halpoja tuottaa ja jotka voidaan viedä nukleinihappokohteisiin ja hybridisoida niiden kanssa elimistössä, on se että syntetisoidaan oligonukleosidisekvenssejä, joissa on muutoksia normaalissa fosfaatti-sokeri-runkorakenteessa.

Yleisesti on raportoitu kaksi oligonukleosidisekvenssiä joissa on muutettu runkoja. Ensimmäiseen tyyppiin sisältyy muutoksia normaalissa nukleosidien välisessä fosfodiesterisidoksessa. Toiseen tyyppiin sisältyy fosfodiesterisidoksen korvaaminen nukleosidien välisillä sidoksilla, jotka eivät ole fosfaatteja. Uhlmann, E. ja Peyman, A., Chemical Reviews, 9(4):544-584 (1990).

Muokatut fosfodiesterisidokset, jotka on raportoitu tähän mennessä, ovat fosforitioaatteja, alkyylifosforiestereitä, metyylifosfonaatteja ja alkyylifosforiamidaatteja.

Fosforitioaatilla muokatut fosfodiesterisidokset viittaavat fosforidiesterisidoksiin, joissa yksi tai useampi siltana oleva happiatomi korvataan rikillä. Sellaiset sidokset eivät kuitenkaan sovellu antisense-yhdisteissä käytettäväksi. Kiraalisen fosforikeskuksen säilyminen johtaa monotioaattien steeriseen vaihteluun. Lisäksi sekä mono- että ditioaateista puuttuu sekvenssispesifinen hybridisaatio ja molemmat poistetaan nopeasti plasmasta. Fosforitioaattien suuri affiniteetti lasiin ja muoviin tekee myös näiden yhdisteiden synteessin vaikeaksi ja tehottomaksi.

Metyyli- ja etyyli- fosfotriestereitä on valmistettu saattamalla fosfodiesterillä kytketyt oligonukleosidit reagoimaan vedettömän metanolin tai etanolin kanssa. Miller, P.S. ym., J. Am. Chem. Soc., 93:6657-6665 (1971).

Triesterisidos oligodeoksiribonukleotidietyyli- fosfotriestereissä on stabiili normaaleissa fysiologisissa pH-olosuhteissa, vaikkakin se voidaan hydrolysoida vahvalla hapolla tai emäksellä. Metyyli- fosfotriesterit ovat vähemmän stabiileja kuin etyyli- ja muut alkyylifosfotriesterit neutraalissa pH:ssa, mikä johtuu liuottimen aikaansaamasta nukleofiilisen syrjäytymisen mahdollisuudesta triesterimetyyliryhmässä. Oligodeoksiribonukleotidietyyli- fosfotriesterit vaikuttavat olevan täysin resistenttejä eksonukleaasien aikaansaamalle hydrolyysille eivätkä nautan sikiön seerumissa tai ihmisen veren seerumissa olevat nukleaasit tai esteraasit hydrolysoi niitä. Uhlmann, yllä.

Metyyli- fosfonaateilla on useita merkittäviä puutteita terapeuttisen potentiaalin kannalta, joihin kuuluvat huono liukoisuus veteen, kiraaliset fosforikeskukset, kyvyttömyys hallita korkean saannon stereoselektiivistä synteesiä, nopea poistuminen plasmasta ja erittyminen virtsaan.

Oligodeoksiribonukleosidifosforamidaateilla on nukleosidien välisiä sidoksia, jotka sisältävät typpi- fosfo-

ri-sidoksia. Nämä nukleiinihappoanalogit voidaan valmistaa fosforamadiittivälimuodoista tai hapettamalla H-fosfonaattivälimuotoja primäärisen tai sekundäärisen amiinin läsnäollessa. H-fosfonaattianalogien ja hapetusreaktion valmistus voidaan suorittaa helposti kaupallisessa DNA-syntetisaattorissa.

Erilaisia ionittomia oligonukleotidisekvenssejä, jotka sisältävät fosfaatittomia nukleosidien välisiä sidoksia, kuten karbonaatti-, karbamaatti- ja dialkyyli- tai diaryylisilyyli johdannaisia, on syntetisoitu ja raportoitu.

Vaikkakin karbonaattisidos on vastustuskykyinen hapon aikaansaamalle hydrolyysille, se lohkeaa varsin helposti emäksellä, ja täten tarvitaan erityisiä varotoimia suojausryhmien poistamista varten synteessin lopussa. Vaikkakin poly(U)-analogien ja nukleosidien välisiä karboksimetyylisidoksia sisältävien poly(dA)-analogien välillä on havaittu stabiileja duplekseja, muita emäksiä ei ole tutkittu. Täten ei tiedetä, häiritseekö karbonaattisidos dupleksin muodostuksen tarkkuutta muiden emästen kanssa.

Nukleosidien välisten karbamaattien on raportoitu olevan vesiliukoisempia kuin muiden nukleosidien välisten siltojen. Karbamaattisidosten hyödyllisyys on kuitenkin rajallinen, koska tyminikarbamaatit eivät muodosta hybridejä komplementaarisen DNA:n kanssa, ja sytosiinikarbamaatit eivät hybridisoidu guaniinioligomeerien kanssa.

Karbamaattisidos, kuten karbonaattisidoskin, on stabiili fysiologisissa oloissa. Toisin kuin karbonaatit, karbamaattisidos on kuitenkin stabiili emästen aiheuttaman hydrolyysin suhteen, mikä ominaisuus yksinkertaistaa tämän sidoksen sisältävien oligomeerien synteisiä. Karbamaattisidos on resistentti nukleaaasihydrolyysille.

Kuten karbonaatti- ja asetaattisidoksetkin, karbamaattisidos ei muistuta muodoltaan nukleotidien välistä fosfodiesterisidosta. Molekyyylimallit viittaavat kuitenkin

siihen, että sidoksen pitäisi sallia se, että oligomeeri
 saa konformaatioita, jotka sallisivat sen muodostaa vety-
 silloin komplekseja komplementaaristen nukleiinihappojen
 kanssa. On olemassa ristiriitaisia raportteja, jotka kos-
 5 kevat karbamaattioligomeerien ja komplementaaristen nukle-
 iinihappojen muodostamien dupleksien stabiiliutta. Karba-
 maattisidoksinen oligomeeri, joka sisältää kuusi tymi-
 diiniyksikköä, ei muodosta komplekseja $A(pA)_5:n$ eikä
 $dA(pA)_5:n$ kanssa. Toisaalta karbamaattisidoksinen oligo-
 10 meeri, joka sisältää kuusi deoksisytosiiniyksikköä, muo-
 dostaa stabiileja komplekseja $d-(pG)_6:n$ ja $poly(dG):n$ kans-
 sa.

Dialkyyli- tai difenyylisilyylioligomeerianalogien
 nukleosidien välinen sidos muistuttaa läheisesti nukleo-
 15 tidien välisen normaalin fosfodiesterisidoksen tetraedraa-
 lista geometriaa. Oligomeerit valmistetaan liuoksessa
 saattamalla reagoimaan soveliaalla tavalla suojattu nuk-
 leosidi-3'-O-dialkyyli- tai difenyylisilyylikloridi tai
 trifluorimetaanisulfonyyli johdannainen 3'-suojatun nukle-
 20 osidin kanssa vedettömässä pyridiinissä. Ensin mainittu
 voidaan valmistaa saattamalla reagoimaan 5'-O-trityyli-
 nukleosidi dialkyyli- tai difenyylidikloorisilaanin kanssa
 tai bis(trifluorimetaanisulfonyyli)di-isopropyylisilaanin
 kanssa.

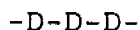
25 Koska dialkyyli- ja difenyylisilyylisidokset ovat
 hapon aiheuttamalle hydrolyysille herkkiä, suojausryhmät
 täytyy valita huolella synteesiä varten. Ogilvie ja Cor-
 mier ovat raportoineet nukleosididimeerit ja heksameerit,
 joilla on nukleosidien välisiä siloksaanisidoksia, ja me-
 30 netelmän jolla sellaisia polymeerejä voidaan syntetoida.
 Katso esimerkiksi Ogilvie, K.K. ja Cormier, J.F., Tetrahe-
 dron Letters, 26(35):4159-4162 (1985); Cormier J.F. ja
 Ogilvie, K.K., Nucleic Acids Research, 16(10):4583-4594
 (1988).

Vaikkakin karbonaatilla, karbamaatilla ja silyy-
 lillä liitettyillä oligonukleosidisekvensseillä on vaadit-
 tava nukleaasiresistenssi, mikä tekee niistä houkuttelevia
 ehdokkaita "antisense"-reagensseiksi, niiden toimintakykyä
 5 tässä ominaisuudessa ei ole vielä raportoitu. Lisäksi näi-
 den oligomeerien kykyä joutua solujen sisäänottamiksi vil-
 jelmässä ei ole raportoitu. Mahdollinen hankaluus näiden
 oligomeerien kanssa on niiden raportoitu alhainen liukoi-
 suus vesiliuoksessa. Ei ole selvää, voidaanko saada aikaan
 10 riittäviä konsentraatioita niiden tehokasta käyttöä varten
 biologisissa kokeissa, vaikkakin liukoisuutta voitaisiin
 oletettavasti lisätä tuomalla molekyyleihin hydrofiilisiä
 ryhmiä.

Tämä keksintö tarjoaa oligonukleotidianalogiyhdys-
 15 teitä, koostumuksia jotka sisältävät sellaisia yhdisteitä,
 välituotteita sellaisten yhdisteiden valmistamista varten
 ja menetelmiä, joilla voidaan syntetoida sellaisia uusia
 stabiileja, nukleaasiresistenttejä, kohdespesifisiä, ras-
 valiukoisia oligonukleotidianalogeja.

20 Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö tarjoaa nukleotidianalogiyhdisteitä,
 jotka sisältävät oligonukleosidisekvenssejä, joissa on
 noin 6 - noin 200 emästä ja joissa on kolmiatominen nukle-
 osidien välinen sidos. Sellaisilla oligonukleosidisekvens-
 25 sien kolmiatomisilla nukleosidin välisillä sidoksilla on
 kaava:



jossa kukin D on toisistaan riippumatta CHR, happi tai NR^6 ,
 30 jossa R on toisistaan riippumatta vety, OH, SH tai NH_2 , R^6
 on vety tai C_{1-2} -alkyyli, sillä edellytyksellä että vain
 yksi D on happi tai NR^6 .

Edullisessa suoritusmuodossa oligonukleosidisek-
 venssit sisältävät emäksiä, jotka ovat joko adeniini, sy-

tosiini, guaniini, urasiili, tyymiini ja niiden modifikaatioita.

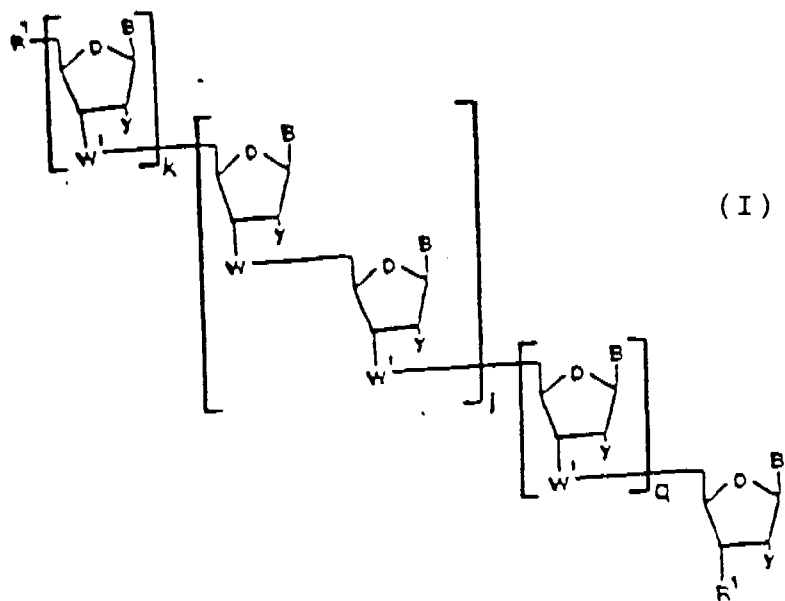
Erityisemmin tämän keksinnön yhdisteet sisältävät oligonukleosidisekvenssejä, joilla on kaava I:

5

10

15

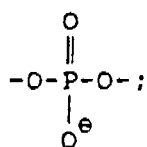
20



25

jossa W on D-D-D, jossa kukin D on toisistaan riippumatta CHR, happi tai NR^6 , jossa R on itsenäisesti vety, OH, SH tai NH_2 , R^6 on vety tai C_{1-2} -alkyyli sillä edellytyksellä, että vain yksi D on happi tai NR^6 ; kukin W' on toisistaan riippumatta W tai

30



35

kukin R^1 on toisistaan riippumatta OH, SH, NR^2R^3 , jossa kukin R^2 ja R^3 on toisistaan riippumatta vety tai C_{1-6} -alkyyli tai NHR^4 , jossa R^4 on C_{1-12} -asyyli;

kukin y on toisistaan riippumatta H tai OH;

kukin B on toisistaan riippumatta adeniini, sytosiini, guaniini, tyymiini, urasiili tai sen modifikaatio;

j on kokonaisluku 1 - noin 200;

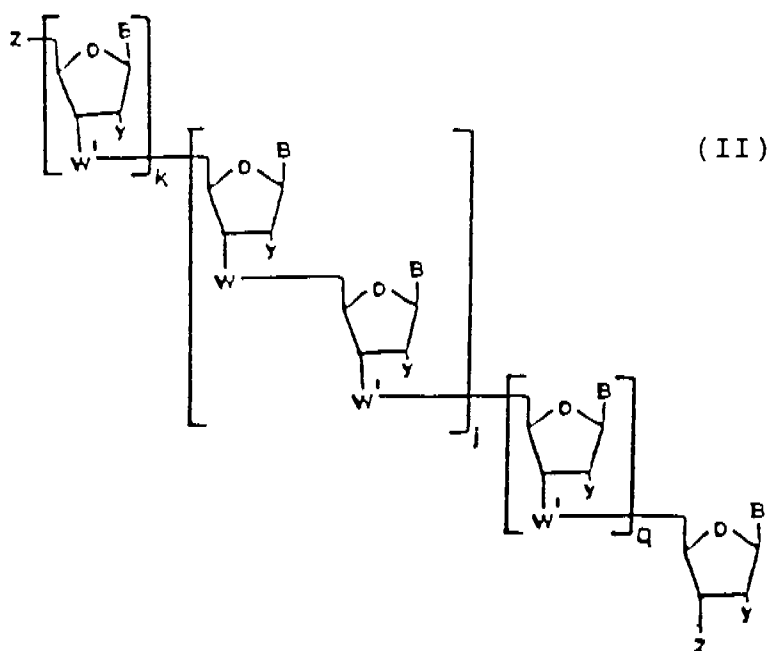
5 k on 0 tai kokonaisluku 1 - noin 197; ja

q on 0 tai kokonaisluku 1 - noin 197, sillä edellytyksellä, että summa $j + k + q$ on noin 4 - noin 200.

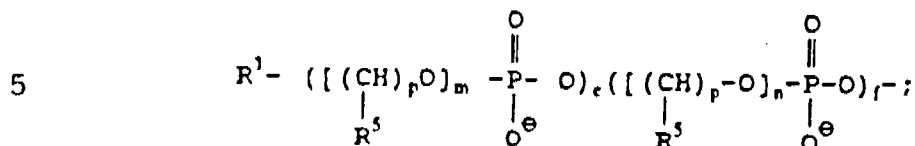
10 Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet sisältävät oligonukleotidi- tai oligonukleosidisekvenssejä, joissa on mahdollisesti dioli kummassa jommassa päässä tai molemmis-
sa päissä.

Edullisia dioleja ovat 1,2-diolit (glykolit). Edustavia glykoleja ovat polyalkyleeniglykolit, edullisesti polyetyleeniglykolit tai polypropyleeniglykolit. Edullisia
15 glykoleja ovat tetraetyleeniglykoli ja heksaetyleeniglykoli. Sovelliaat diolit voivat sisältää myös polyoleja, joissa kaikki hydroksyyli-
lit kahta lukuunottamatta on tukittu.

20 Siellä missä tämän keksinnön yhdisteet ovat oligonukleosidisekvenssejä, joissa on dioli kummassa jommassa
päässä tai molemmissa päissä, tämän keksinnön yhdisteillä on kaava II:

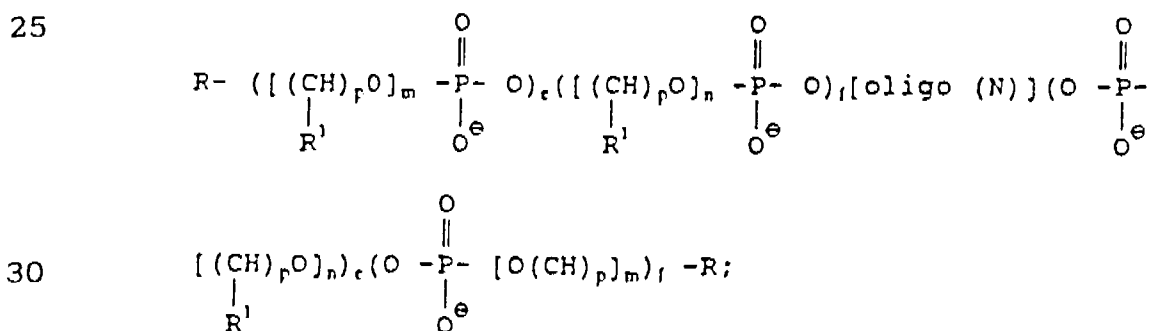


missä kukin Z on toisistaan riippumatta R' tai



- missä kukin R¹ on toisistaan riippumatta OH, SH, NHR²R³,
 10 jossa R² ja R³ ovat toisistaan riippumatta vety, tai C₁₋₆-alkyyli, tai NHR⁴, missä R⁴ on C₁₋₁₂-asyyli;
 kukin R⁵ on toisistaan riippumatta vety tai C₁₋₁₂-alkyyli;
 kukin ryhmästä W, W', Y, B, j, k ja q on yllä olevan määritelmän mukainen;
 15 kukin e ja f on toisistaan riippumatta 0 - 50 sillä edellytyksellä, että ainakin yksi e ja f on ainakin 1;
 kukin m ja n on toisistaan riippumatta 1 - 200; ja
 kukin p on toisistaan riippumatta 2 - 4.

- Edullisessa suoritusmuodossa summa j + k + q on
 20 noin 9 - noin 50 emästä, edullisemmin noin 12 - noin 25, ja edullisimmin noin 15 - noin 18. Tässä suoritusmuodossa tämän keksinnön mukaiset yhdisteet sisältävät oligonukleotideja, joilla on kaava:



- jossa R on OH, SH, NR²R³, jossa R² ja R³ ovat toisistaan riippumatta vety tai C₁₋₆-alkyyli, tai NHR⁴, jossa R⁴ on
 35 C₁₋₁₂-asyyli;

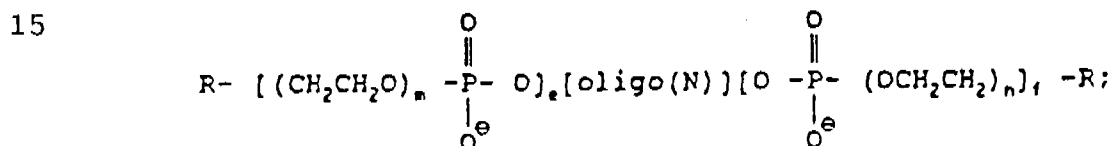
R^1 on vety tai C_{1-12} -asyyli;

oligo (N) on luonnollinen tai muokattu oligonukleotidisekvenssi, jossa on noin 9 - noin 200 emästä;

- 5 kukin e ja f on toisistaan riippumatta 0 - 50, sillä edellytyksellä, että ainakin yksi e ja f on ainakin 1;
 kukin m ja n on toisistaan riippumatta 1 - 200; ja
 kukin p on toisistaan riippumatta 2 - 4.

- 10 Edullisessa suoritusmuodossa oligonukleotidi sisältää homopolymeerisessä tai heteropolymeerisessä sekvenssissä minkä tahansa dA:n, dC:n, dG:n tai T:n yhdistelmän.

Siellä missä glykoli on polyetyleeniglykoli, tämän suoritusmuodon mukaiset yhdisteet sisältävät oligonukleotideja, joilla on kaava:



- 20 jossa R on OH, SH, NR^2R^3 , jossa R^2 ja R^3 ovat toisistaan riippumatta vety tai C_{1-6} -alkyyli, tai NHR^4 , jossa R^4 on C_{1-12} -asyyli;

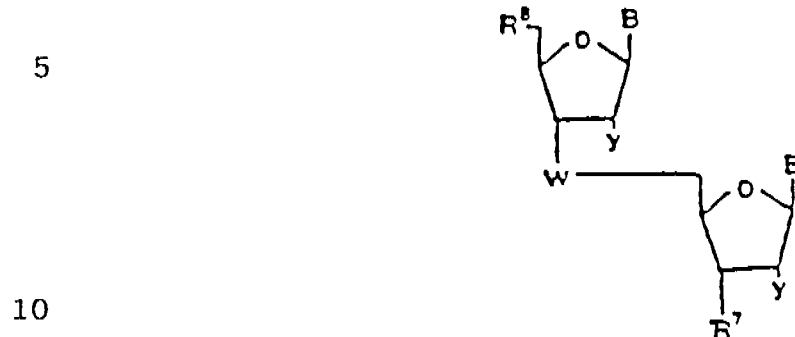
oligo N on oligonukleotidisekvenssi, jossa on noin 9 - noin 50 emästä;

- 25 e ja f ovat toisistaan riippumatta 0 - 50, sillä edellytyksellä että ainakin yksi e ja f on ainakin 1;

m ja n ovat toisistaan riippumatta 0 - 200, sillä edellytyksellä että ainakin yksi m ja n on 1 - 200.

- 30 Tämän keksinnön oligonukleotidit voivat sisältää tunnettuja nukleosidien välisiä kytkentäryhmiä, kuten fosfodiesteri, silyyli ja muut hyvin tunnetut kytkentäryhmät, sillä edellytyksellä että ne sisältävät tehokkaan määrän tämän keksinnön mukaisia -D-D-D-kytkentäryhmiä ja/tai tämän keksinnön mukaisia diolipääteryhmiä.

Tämä keksintö on myös suunnattu nukleosididimeerejä kohtaan, joilla on kaava:



jossa W on -D-D-D-, jossa kukin D on toisistaan riippumatta CHR, happi tai NR^6 , jossa R on toisistaan riippumatta vety, OH, SH tai NH_2 , R^6 on vety tai C_1 - C_2 -alkyyli, sillä edellytyksellä että vain yksi D on happi tai NR^6 ; kukin B on toisistaan riippumatta adeniini, sytosiini, guaniini, tymiini, urasiili tai niiden modifikaatio; R^7 on OH, t-butyylidimetyylisilyylioksi tai fosforamidiitti, ja R^8 on OH, suojausryhmä tai t-butyylidimetyylisilyylioksi.

15

20

Tämä keksintö tarjoaa lisäksi menetelmän, jolla voidaan estää oligonukleotidisekvenssejä sisältävien yhdisteiden hajoaminen nukleaasin vaikutuksesta. Tämä menetelmä sisältää sen, että dioli kiinnitetään joko mainitun yhdisteen 5'- tai 3'-päähän tai molempiin päihin. Diolit kiinnitetään 5'- ja/tai 3'-päähän saattamalla oligonukleotidiyhdisteet reagoimaan alkoksitrityyylidiolisyanofosfiinin kanssa, edullisesti dimetoksitrityyyliglykolisyanofosfiinin tai monometoksitrityyyliglykolisyanofosfiinin kanssa.

25

30

Tämä keksintö tarjoaa lisäksi menetelmän, jolla voidaan estää luonnollisten tai muokattujen nukleotidiyhdisteiden hajoaminen nukleaasin vaikutuksesta, joka sisältää sen että valmistetaan oligonukleotidisekvenssejä, joissa on noin 6 - noin 200 emästä, joissa on kolmiatominen

35

nukleosidin välinen sidos, jolla on kaava -D-D-D-, kuten tässä määritellään.

Tämä keksintö tarjoaa myös koostumuksia, jotka ovat hyödyllisiä kun halutaan inhiboida geeniekspressiota, jotka sisältävät yhdisteitä, jotka sisältävät oligonukleosidisekvenssejä, joissa on noin 6 - noin 200 emästä, joissa on kolmiatominen nukleosidin välinen sidos, kuten tässä määritellään, ja fysiologisesti sovelias kantaja. Yhdisteessä voi olla dioli kummassa jommassa päässä tai molemmissa päissä. Edulliset diolit ovat polyetyleeniglykoleja.

Tämä keksintö tarjoaa myös menetelmän, jolla voidaan inhiboida geeniekspressiota, joka sisältää sen että sellaisen hoidon tarpeessa olevalle nisäkkäälle annetaan tehokas määrä yhdistettä, joka joissa on noin 6 - noin 200 emästä, joissa on kolmiatominen nukleosidin välinen sidos, kuten tässä määritellään. Yhdisteissä voi olla dioli kummassa jommassa päässä tai molemmissa päissä. Edulliset diolit ovat polyetyleeniglykoleja.

Kuvioiden lyhyt kuvaus

Kuvio 1a esittää synteesireittiä, jolla voidaan valmistaa nukleosidialdehydi (yhdiste I).

Kuvio 1b esittää synteesireittiä, jolla voidaan valmistaa fosfoniumjodididnukleosidi (yhdiste II).

Kuvio 2 esittää synteesireittiä, jolla voidaan valmistaa nukleosididimeereitä, joita yhdistää kolmiatominen nukleosidin välinen sidos, jotka käyttävät vastaavasti hyödyksi kuvioiden 1a ja 1b aldehydinukleosidia ja fosfoniumjodididnukleosidia.

Kuvio 3 esittää synteesireittiä, jolla voidaan valmistaa tymidiinidimeeri, joka käyttää hyödyksi tymidiinaldehydiä ja fosfoniumjodidialdehydiä (yhdisteet I ja vastaavasti II).

Kuvio 4 esittää synteesireittiä, jolla voidaan valmistaa nukleosididimeeri, jota yhdistää kahden hiili- ja yhden typpi-atomin muodostama nukleosidin välinen sidos,

joka on muotoa 3'-C-C-N-5'. Dimeerit syntetoidaan niin, että saatetaan reagoimaan aldehydejä (CHO) sisältävät nukleosidit reagoimaan amiinifunktionaalisuuksia (NH₂) sisältävien nukleosidien kanssa pelkistävässä olosuhteissa.

5 Kuvio 5 esittää synteesireittiä, jolla voidaan valmistaa nukleosididimeeri, jota yhdistää kahden hiili- ja yhden typpiatomin muodostama nukleosidin välinen sidos, joka on muotoa 3'-N-C-C-5'. Dimeerit syntetoidaan niin, että saatetaan reagoimaan aldehydejä sisältävät nukleosidit reagoimaan amiinifunktionaalisuuksia sisältävien nukleosidien kanssa pelkistävässä olosuhteissa.

10 Kuvio 6 esittää synteesireittiä, jolla voidaan valmistaa tymidiinidimeeri, jota yhdistää kahden hiili- ja yhden typpiatomin muodostama nukleosidin välinen sidos, 15 joka on muotoa 3'-C-C-N-5'. Dimeerit syntetoidaan niin, että saatetaan reagoimaan aldehydejä (CHO) sisältävät nukleosidit amiinifunktionaalisuuksia (NH₂) sisältävien nukleosidien kanssa pelkistävässä olosuhteissa.

20 Kuvio 7 esittää synteesireittiä, jolla voidaan valmistaa tymidiinidimeeri, jota yhdistää kahden hiili- ja yhden typpiatomin muodostama nukleosidin välinen sidos, joka on muotoa 3'-N-C-C-5'. Dimeerit syntetoidaan niin, että saatetaan reagoimaan aldehydejä sisältävät nukleosidit amiinifunktionaalisuuksia sisältävien nukleosidien 25 kanssa pelkistävässä olosuhteissa.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tämän keksinnön yhdisteet ovat yleisesti oligonukleotidi- tai oligonukleosidisekvenssejä, jotka ovat vastustuskykyisiä nukleaasin aiheuttamalle hajottamiselle.

30 Tässä käytettynä "nukleosidi" viittaa puriini- tai pyrimidiiniemäksen yhdistelmään viisihiilisen sokerin (pentoosin) kanssa.

Tässä käytettynä "nukleotidi" viittaa nukleosidin fosforihappoesteriin.

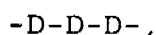
Tässä käytettynä "oligonukleotidi" viittaa polynukleotideihin, joissa on vain nukleosidien välisiä fosfodiesterisidoksia, esimerkiksi "luonnolliseen" DNA:han tai RNA:han.

5 Esimerkkिनukleosideja ovat adensiini (A), guansiini (G), sytidiini (C), uridiini (U), deoksiadenosiini (dA), deoksiguanosiini (dG), deoksisytidiini (dC) ja tymidiini (T).

10 Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet sisältävät oligonukleosidisekvenssejä, joissa on noin 6 - noin 200 emästä, ja joissa on nukleosidien välinen fosfodiesterisidos tai kolmiatominen sidos. Kolmiatominen nukleosidin välinen sidos (-D-D-D-) sisältää 1) kolme hiiliatomia, 2) kaksi hiiliatomia ja yhden happiatomin tai 3) kaksi hiiliatomia ja yhden typpiätomia.

15 Oligonukleosidisekvenssit ovat luonnollisten tai muokattujen nukleosidien sekvenssejä. Tässä käytettynä fraasi "nukleosidien välinen sidos" viittaa atomeihin ja molekyyleihin, jotka muodostavat sillan yhden luonnollisen tai muokatun nukleosidin sokeriosan kohdassa 3 olevan hiiliatomin ja vieressä olevan sellaisen nukleosidin sokeriosan kohdassa 5 olevan hiiliatomin välillä. Sokeriosa voi olla joko riboosi- tai deoksiriboosiosa tai sen analogi. Täten nukleosideihin kuuluvat A, C, G, U, dA, dC, dG
20 tai T tai niiden modifikaatiot, kuten esimerkiksi 5-bromi tai 5-jodiurasiili, 5-metyylisytyosiini, isosytyosiini (2-amino-4-oksipyrimidiini), isoguaniini (2-oksi-6-amino-puriini), inosiini (6-oksipuriini), 5-vinyyliurasiili ja 5-vinyylisytyosiini.

25 30 Kolmiatomisella nukleosidien välisellä sidoksella on kaava:



jossa kukin D on toisistaan riippumatta CHR, happi tai NR⁶, jossa R on toisistaan riippumatta vety, OH, SH tai NH₂,

happi, R^6 on vety tai C_1 - C_2 -alkyyli, sillä edellytyksellä että vain yksi D on happi tai NR^6 .

Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet sisältävät oligonukleosidisekvenssit, joilla on kaava I:

5

10

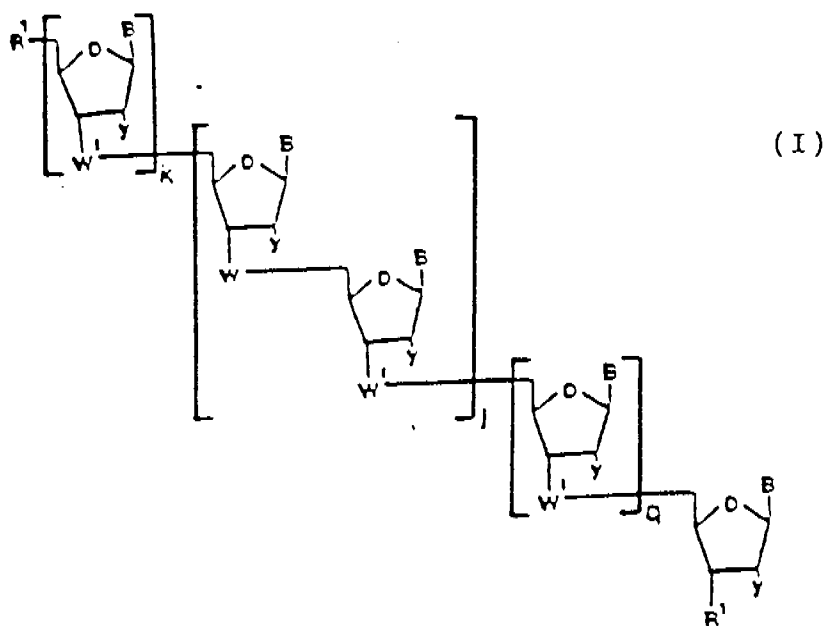
15

20

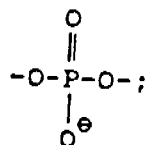
25

30

35



jossa W on -D-D-D-, jossa kukin D on toisistaan riippumatta CHR, happi tai NR^6 , jossa R on toisistaan riippumatta vety, OH, SH tai NH_2 , R^6 on vety tai C_{1-2} -alkyyli, sillä edellytyksellä että vain yksi D on happi tai NR^6 ; kukin W on toisistaan riippumatta W tai



kukin R^1 on toisistaan riippumatta OH, SH, NR^2R^3 , jossa R^2 ja R^3 ovat toisistaan riippumatta vety tai C_{1-6} -alkyyli tai NHR^4 , jossa R^4 on C_{1-12} -alkyyli; kukin y on toisistaan riippumatta H tai OH;

kukin B on toisistaan riippumatta adeniini, sytosiini, guaniini, tymiini, urasiili tai sen modifikaatio;

j on kokonaisluku väliltä 1 - noin 200;

k on 0 tai kokonaisluku väliltä 1 - noin 197; ja

5 q on 0 tai kokonaisluku väliltä 1 - noin 197, sillä edellytyksellä että summa $j + k + q$ on noin 4 - noin 200.

Edullisessa suoritussuodossa summa $j + k + q$ on noin 9 - noin 50. Edullisemmassa suoritussuodossa summa $j + k + q$ on noin 12 - noin 25, ja edullisemmin noin 15 -
10 noin 18.

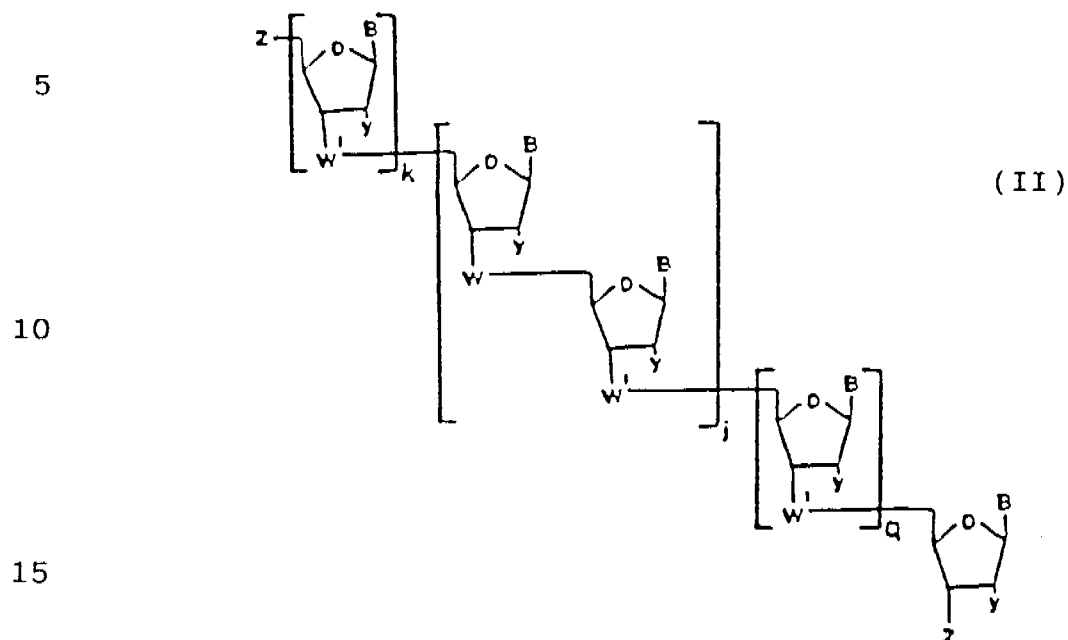
Tämän keksinnön mukaisilla yhdisteillä voi olla dioli jommassa kummassa päässä tai molemmissa päissä. Edulliset diolit ovat glykoleja, tunnettu myös nimellä 1,2-diolit, jotka sisältävät kaksi hydroksyyli-ryhmää vierekkäisissä hiilissä. Edullisia glykoleita ovat polyalkyleeniglykolit. Termi "alkyleeni" tässä käytettynä viittaa ketjultaan suoriin ja haarautuneisiin radikaaleihin, joissa on 2 - 4 hiiliatomia, jotka voivat mahdollisesti olla substituoituja kuten tässä määritellään. Sellaista edustavia radikaaleja ovat etyleeni, propyleeni, isobutyleeni ja vastaavat. Edullisia polyalkyleeniglykoleja ovat polyetyleeniglykolit kuten heksaetyleeniglykoli ja tetraetyleeniglykoli. Soveliaisiin dioleihin voivat kuulua myös polyolit, joissa kaikki hydroksyyli-ryhmät kahta lukuunottamatta on suojattu.
15
20
25

Diolit kiinnitetään joko oligonukleosidien 5'- tai 3'-päähen tai molempiin päihin fosfodiesterisidoksilla. Yhdessä suoritussuodossa diolit kiinnitetään vain yhteen oligonukleosidisekvenssin päähän.

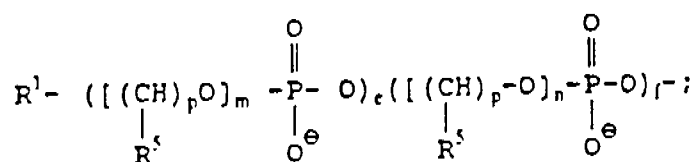
30 Terminaalinen dioli kytketään osaan, joka on joko hydroksyyli (OH), sulfhydryyli (SH), amino (NH₂), alkyyliamino (NH-alkyyli), dialkyyliamino (N[alkyyli]₂) ja amido (NH[asyyli]).

Siellä missä glykoleja on läsnä jommassa kummassa
35 päässä tai molemmissa päissä, tämän keksinnön mukaiset

yhdisteet käsittävät oligonukleotidisekvenssit, joilla on kaava II:



20 jossa kukin Z on toisistaan riippumatta R' tai



jossa kukin R¹ on toisistaan riippumatta OH, SH, NHR²R³, jossa R² ja R³ ovat itsenäisesti vety tai C₁₋₆-alkyyli tai NHR⁴, jossa R⁴ on C₁₋₁₂-asyyli;

30 kukin R⁵ on itsenäisesti vety tai C₁₋₁₂-alkyyli;

kukin W, W', Y, B, j, k ja q on yllä olevan määrittelyn mukainen;

kukin e ja f on toisistaan riippumatta 0 - 50, sillä edellytyksellä että ainakin yksi e ja f on ainakin 1;

kukin m ja n on toisistaan riippumatta 1 - 200; ja kukin p on toisistaan riippumatta 2 - 4.

Edullisessa suoritusmuodossa m ja n ovat toisistaan riippumatta 1- 6 ja summa j + k + q on noin 9 - noin 50.

5 Edullisemmassa suoritusmuodossa summa j + k + q on noin 12 - 25, edullisemmin noin 15 - noin 18.

Toisessa edullisessa suoritusmuodossa tämän keksinnön mukaiset yhdisteet sisältävät oligonukleotidisekvenssejä, joissa on noin 9 - noin 200 emästä, ja joissa on 10 dioli jommassa kummassa päässä tai molemmissa päissä. Vielä toisessa edullisessa suoritusmuodossa tämän keksinnön yhdisteet sisältävät oligonukleotidisekvenssejä, joissa on noin 9 - noin 200 emästä, ja joissa on tämän keksinnön mukainen (-D-D-D-)-sidös.

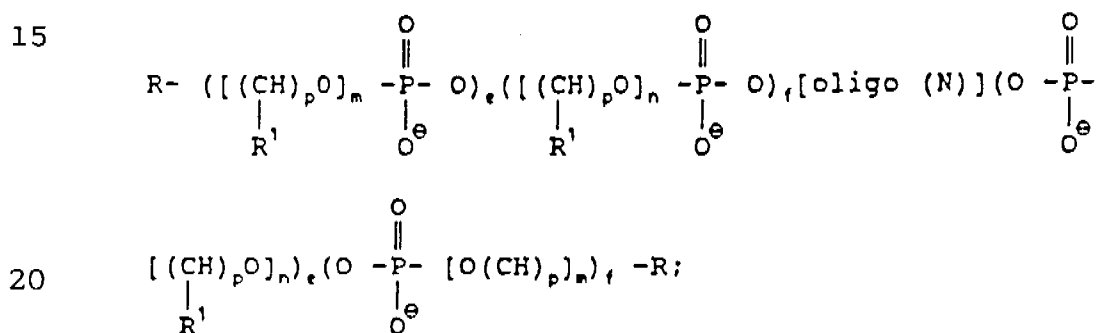
15 Edulliset diolit ovat glykoleja, tunnettu myös nimellä 1,2-diolit, jotka sisältävät kaksi hydroksyyli ryhmää vierekkäisissä hiilissä. Edullisia glykoleita ovat polyalkyleeniglykolit. Termi "alkyleeni" tässä käytettynä viittaa ketjultaan suoriin ja haarautuneisiin radikaaleihin, 20 joissa on 2 - 4 hiiliatomia, jotka voivat mahdollisesti olla substituoituja kuten tässä määritellään. Sellaisia edustavia radikaaleja ovat etyleeni, propyleeni, butyleeni ja vastaavat. Edullisia polyalkyleeniglykoleja ovat polyetyleeniglykolit. Edullisempia ovat tetraetyleeniglykoli ja heksaetyleeniglykoli. 25

Diolit kiinnitetään fosfodiesterisidoksilla oligonukleotidien joko 5'- tai 3'-päähän tai molempiin päihin. Yhdessä suoritusmuodossa diolit kiinnitetään vain yhteen oligonukleotidisekvenssin päähän.

30 Terminaalinen dioli kytketään osaan, joka on joko hydroksyyli (OH), sulfhydryyli (SH), amino (NH₂), alkyyli-amino (NH-alkyyli), dialkyyliamino (N[alkyyli]₂) ja amido (NH[asyyli]). Tässä käytettynä "alkyyli" viittaa ketjultaan suoriin tai haarautuneisiin radikaaleihin, joissa on 35 1 - 12 hiiliatomia, jotka voivat mahdollisesti olla subs-

tituoituja kuten tässä määritellään. Edustaviin alkyyli- ja dialkyyliaminoradikaaleihin kuuluvat metyyli-, etyyli-, propyyli-, butyyli-, pentyyli-, heksyyli-, dimetyyli-, dietyyli-, dipropyyli-, dibutyyli-, dipentyyli- ja diheksyyliamiinit ja vastaavat. Tässä käytettynä "NH(asyyli)" tai "amido" viittaa ketjultaan suoriin tai haarautuneisiin radikaaleihin, joissa on 1 - 12 hiiliatomia, joissa on terminaalinen $O=CNH_2$ -ryhmä. Edustaviin amidoradikaaleihin kuuluvat metanamidi, etanamidi, propanamidi, butanamidi, pentanamidi, heksanamidi, heptanamidi, oktanamidi, nonanamidi, dekanamidi, undekanamidi ja dodekanamidi.

Yhdessä suoritusmuodossa tämän keksinnön yhdisteet sisältävät oligonukleotideja, joilla on kaava:



jossa R on OH, SH, NR^2R^3 , jossa R^2 ja R^3 ovat toisistaan riippumatta vety tai C_{1-6} -alkyyli, tai NHR^4 jossa R^4 on C_{1-12} -asyyli;

R^1 on vety tai C_{1-12} -alkyyli;

Oligo (N) on luonnollinen tai muokattu oligonukleotidisekvenssi, jossa on noin 9 - noin 200 emästä;

kukin e ja f on toisistaan riippumatta 0 - 50;

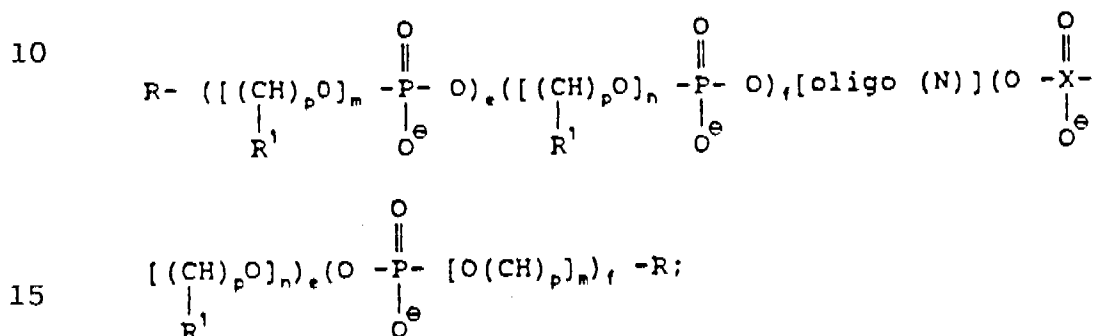
kukin m ja n on toisistaan riippumatta 1 - 200; ja

kukin p on toisistaan riippumatta 2 - 4.

Oligonukleotidisekvenssi on edullisesti homopolymeeri- tai heteropolymeerisekvenssi, joka sisältää minkä tahansa dA:n, dC:n, dG:n, T:n tai näiden analogien yhdistelmän.

Edullisessa suoritusmuodossa m ja n ovat itsenäisesti 1 - 8 ja edullisemmin sekä m että n ovat 4. Edulliset oligonukleotidisekvenssit sisältävät noin 9 - noin 50 emästä, edullisemmin noin 12 - noin 25 emästä, ja edullisimmin noin 15 - noin 18 emästä.

Edullisessa suoritusmuodossa "antisense"-yhdisteillä on polyetyalkyleeniglykoli sekä 5'- että 3'-päissä ja niillä on kaava:



jossa R on OH, SH, NR^2R^3 , jossa R^2 ja R^3 ovat toisistaan riippumatta vety tai C_{1-6} -alkyyli, tai NHR^4 jossa R^4 on C_{1-12} -asyyli;

R^1 on vety tai C_{1-12} -alkyyli;

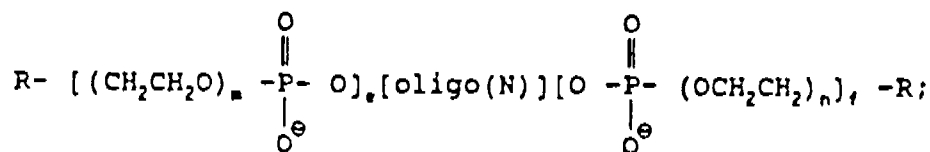
oligo-(N) on luonnollinen tai muokattu oligonukleotidisekvenssi, jossa on noin 9 - noin 200 emästä;

kukin e ja f on toisistaan riippumatta 1 - 50;

kukin m ja n on toisistaan riippumatta 1 - 200; ja

kukin p on toisistaan riippumatta 2 - 4.

Siellä missä glykoli on polyetyleeniglykoli, tämän suoritusmuodon mukaiset yhdisteet sisältävät oligonukleotideja, joilla on kaava:



jossa R on OH, SH, NR^2R^3 , jossa R^2 ja R^3 ovat toisistaan riippumatta vety tai C_{1-6} -alkyyli, tai NHR^4 jossa R^4 on C_{1-12} -asyyli;

oligo-N on oligonukleotidisekvenssi, jossa on noin 9 -
5 noin 50 emästä; ja

e, f, m ja n ovat kukin toisistaan riippumatta 1 - 50.

Edullisessa suoritusmuodossa oligonukleotidi sisältää homopolymeerisessä tai heteropolymeerisessä sekvenssissä minkä tahansa dA:n, dC:n, dG:n tai T:n yhdistelmän.

10 Toisissa edullisissa suoritusmuodoissa polyetyleeniglykoli on tetraetyleeniglykoli (TEG) ja sekä m että n ovat 4, tai heksaetyleeniglykoli ja sekä m että n ovat 6.

Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet ovat hyödyllisiä "antisense"-agensseina. "Antisense"-agenssit hybridisoituvat
15 komplementaarisen nukleotidisekvenssin kanssa kohdenukleiinihapossa tarkoituksena inhiboida mainitun kohdenukleiinihapon translaatioon tai transkriptioon liittyvä toiminta. Kohdenukleiinihappo voi olla joko RNA:ta tai DNA:ta.

20 Tämän keksinnön "antisense"-yhdisteet sisältävät oligonukleosidisekvenssejä, joissa on noin 6 - noin 200 emästä, joissa on homopolymeerisiä tai heteropolymeerisiä sekvenssejä, jotka sisältävät emäksiä, jotka ovat joko adeniini (A), sytosiini (C), guaniini (G), urasiili (U),
25 tyymiini (T) ja näiden emästen modifikaatioita. Erityiset sekvenssit valitaan niiden halutun kohteen perusteella. Valittu sekvenssi hybridisoituu kohdenukleiinihapon kanssa. Esimerkkikohteisiin kuuluvat MYC-onkogeeni, RAS-onkogeeni ja virusperäiset nukleiinihapot.

30 Tämän keksinnön yhdisteet voidaan valmistaa seuraavilla menetelmillä:

hiihinen

A. Yhdisteet, joissa on kolmi(atominen) nukleosidien
välinen sidos

Oligonukleosidit, joita yhdistää kolmiatominen nukleosidien välinen sidos, syntetisoidaan niin että nukleo-
35

sident, joissa on aldehydi- ja ylidi-funktionaalisuuksia 3'- ja vastaavasti 6'-kohdissa, saatetaan reagoimaan Wittigin olosuhteissa.

5 Nukleosidialdehydin ja fosfoniumjodidinukleosidin synteesit kaupallisesti saatavissa olevista yhdisteistä esitetään havainnollisesti kuvissa 1a ja vastaavasti 1b. Aldehydi (yhdiste I kuvio 1a) syntetisoidaan tunnetusta 3'-allyyli-3'-deoksi-5'-O-tert-butyylidimetyyllisilyyli-3'tymidiinistä (yhdiste A, kuvio 1). Allyyliyhdiste hape-
10 tetaan regioselektiivisesti katalyyttisellä määrällä osmiumtetroksidia ja N-metyylimorfoliinioksidia ko-oksiantina. Tuloksena oleva dioli (yhdiste B, kuvio 1a) katkaistaan natriumperiodaatilla, jolloin saadaan aldehydi lähes kvantitatiivisella saannolla.

15 Fosfoniumjodidinukleosidin synteesi (yhdiste II, kuvio 1b) seuraa kaupallisesti saatavasta 5'-trityloidusta nukleosidista (yhdiste C, kuvio 1b). Trityloitu nukleosidi silyloidaan 3'-kohdasta tert-butyylidimetyyllisilyylikloridilla ja trityyliryhmä poistetaan happamissa olosuhteissa
20 hyvin tehokkaasti. Tuloksena oleva primäärinen hydroksyyli (yhdiste E, kuvio 1b) hapetetaan Swernin olosuhteissa, jolloin saadaan aldehydi (yhdiste F, kuvio 1b). Epäpuhdas aldehydi saatetaan heti reagoimaan metyyli-trifenyylifosfoniumbromidista johdetun ylidin kanssa, jolloin saadaan
25 4'-vinyyli-4'-deoksi-3'-tert-butyylidimetyyllisilyylinukleosidi hyvällä saannolla. Vinyyliyhdiste hydroboratoitiin regioselektiivisesti, jolloin saatiin primäärinen alkoholi (yhdiste G, kuvio 1b) hyvällä saannolla. Primäärinen alkoholi muutetaan vuorostaan erinomaisella saannolla vastaavaksi jodidiksi (yhdiste H, kuvio 1b) käyttämällä tri-
30 fenyylifosfiinijodia imidatsolin läsnäollessa. Lopuksi jodidi transformoidaan halutuksi fosfoniumjodidinukleosidiksi käyttämällä trifenyylifosfiinia asetonitriilissä.

35 Ylidi valmistetaan fosfoniumjodidinukleosidista käyttämällä kalium-tert-butoksidia emäksenä ja saatetaan

heti reagoimaan aldehydin kanssa, jolloin saadaan Wittigin tuote (yhdiste 1, kuvio 2) hyvällä saannolla. Wittigin reaktion tuote hydrataan regioselektiivisesti 10-prosenttisella palladoidulla hiilellä (10 % Pd-C) vedyn kanssa ilmakehän paineessa kvantitatiivisella saannolla liitoksen kaksoissidoksen tyydyttämiseksi. Tyydyttynyt yhdiste (yhdiste 2, kuvio 2) desilyloidaan tetrabutyyliammoniumfluoridin kanssa, jolloin saadaan dioli (yhdiste 3, kuvio 2). Diolin 5'-primäärihydroksyyli suojataan sitten alue-

5 selektiivisesti dimetoksitrityylikloridilla ja tuloksena oleva 3'-hydroksyyli (yhdiste 4, kuvio 2) muutetaan fosforamidiitiksi (yhdiste 5, kuvio 2) 2-syanoetyyli-N,N-diisopropyylikloorifosforamidiitilla.

Nukleosididimeerit tai korkeammat oligomeerit, joissa on trialkyylisilyylioksi-suojausryhmiä, konjugoidaan niin että muodostuu oligonukleotideja, joilla on mikä tahansa haluttu pituus. Kun ketjun pidentäminen on saatettu loppuun, oligomeerien suojaus poistetaan sinänsä tunnetulla tavalla. Ketjun pidentämiseksi kiinteän faasin syntetisaattorissa, jossa oligomeereja yhdistävät fosfaattisidokset, oligomeerien terminaaliset 5'- ja 3'-hydroksyyli-ryhmät funktionalisoidaan soveliaalla tavalla vastaavasti trityloivilla reagensseilla kuten dimetoksitrityylikloridi ja fosforamidiitti.

25 **B. Yhdisteitä, joissa on kahden hiiliatomin - yhden happiatomin muodostama nukleosidien välinen sidos**

Oligonukleosidisekvenssit, joissa on kahden hiiliatomin ja yhden happiatomin muodostama nukleosidien välinen sidos, syntetoidaan niin että 3'-silyloitu 5'-tolueenisulfonyylinukleosidi saatetaan reagoimaan 5'-suojatun nukleosidin kanssa.

30 3'-asetyyli-5'-aldehydinukleosidi valmistetaan kaupallisesti saatavilla olevasta 3'-asetyylinukleosidista sinänsä tunnetulla tavalla. 3'-asetyyli-5'-aldehydinukleosidi muutetaan sitten 3'-asetyyli-5'-karboksimetoksimety-

35

leeninukleosidiksi käyttämällä modifioitua Wittigin reaktiota.

5'-metyleenisivuketju pelkistetään natriumboorihydridillä alkoholissa, edullisesti isopropanolissa, jota seuraa 3'-asetyyli-ryhmän suojauksen poisto natriummetoksidilla alkoholissa, edullisesti metanolissa. 3'-hydroksi suojataan sitten silyyli-ryhmällä. Edullisessa suoritussuorituksessa silyyli-ryhmä on t-butyylidimetyylisilyyli-ryhmä.

3'-silyyli-5'-karbometoksimetyyli-nukleosidipelkistetään sitten edelleen nukleosidin 3'-O-silyyli-5'-deoksi-3'-(2''-etanoli) johdannaiseksi isobutyylialumiinihydridillä (DIBAL) tetrahydrofuraanissa (THF). 5'-etanoli-ryhmä muutetaan p-tolueenisulfonyyli-ryhmäksi p-tolueenisulfonyyli-kloridilla pyridiinissä. 5'-p-tolueenisulfonyyli-nukleosidin emäsosan eksosyklinen aminoryhmä suojataan mahdollisesti sinänsä tunnetulla tavalla. Adeniinin ja sytosiinin eksosyklisen aminoryhmien edullinen suojausryhmä on bentsoyyliosa. Guaniinin eksosyklisen aminoryhmän edullinen suojausryhmä on isobutyyliosa. Guaniini voidaan suojata myös O⁶-kohdassa.

3'-O-silyyli-5'-O-p-tolueenisulfonyyli-nukleosidi saatetaan sitten reagoimaan 5'-suojatun nukleosidin kanssa, jolloin muodostuu 3'-O-silyyli-5'-suojattu nukleosididimeeri, jossa on kahden hiiliatomin ja yhden happiatomin muodostama sidos. 5'-O-suojausryhmä on edullisesti triityyli ja edullisemmin dimetoksitriityyli. 3'-O-silyyli-5'-O-suojattu nukleosidi on mahdollisesti suojattu nukleosidin emäsosan eksosyklisten aminoryhmien kohdalla.

Nukleosididimeerien suojaus poistetaan ja ne derivatisoidaan uudestaan 3'-hiiliatomin kohdassa syanofosfiinireagenssilla, edullisesti 2-syanoetoksidi-isopropyyliaminofosfiinilla silmälläpitäen käyttöä ketjun pidentämisessä fosforamidiitti-kiinteän faasin synteesimenetelmällä. Gait, yllä.

Nukleosididimeerit tai korkeammat oligomeerit, joissa on trialkyyilisilyylioksi-suojausryhmiä, konjugoidaan niin että muodostuu oligonukleotideja joilla on mikä tahansa haluttu pituus. Kun ketjun pidentäminen on saatettu loppuun, oligomeerien suojaus poistetaan standardinomaisilla menetelmillä. Ketjun pidentämiseksi edelleen kiinteään faasin syntetisaattorissa, jossa oligomeerejä yhdistävät fosfaattisidokset, oligomeerien terminaaliset 5'- ja 3'-hydroksyyli-ryhmät funktionalisoidaan soveliaalla tavalla vastaavasti trityloivilla reagensseilla kuten dimetoksitrityylikloridi ja fosforamidiitti.

C. Yhdisteet, joissa on kahden hiiliatomin ja yhden tyypiatomin muodostama nukleosidien välinen sidos

Oligonukleosidisekvenssit, joita yhdistää kahden hiiliatomin ja yhden tyypiatomin muodostama nukleosidien välinen sidos muotoa C-C-N, syntetisoidaan niin että aldehydejä sisältävät nukleotidit saatetaan reagoimaan nukleosidien kanssa, jotka sisältävät amiinifunktionaalisuuksia, pelkistävässä oloissa kuten kuviossa 4 havainnollisesti esitetään.

Sekä aldehydi- että amiiniyhdisteet valmistetaan kaupallisesti saatavilla olevista yhdisteistä. Aldehydi valmistetaan 3'-allyyli-3'-deoksi-5'-O-tert-butyylidimeetyylisilylytymidiinistä. Allyyliyhdiste hapetetaan regioselektiivisesti katalyyttisellä määrällä osmiumtetroksidia N-metyylimorfoliinin N-oksidin ollessa läsnä ko-oksidanttina, jolloin saadaan dioli. Dioli hapetetaan vuorostaan natriumperiodaatilla, jolloin saadaan aldehydi lähes kvantitatiivisella saannolla.

Amiiniyhdiste syntetisoidaan kaupallisesti saatavilla olevista nukleosideista. Tyypillisessä menetelmässä nukleosidin primäärinen hydroksyyli-ryhmä transformoidaan regioselektiivisesti tosylaatitryhmäksi p-tolueenisulfonyylikloridilla ja muutetaan sitten jodidiksi. Jodidiväli-
tuotteen 3'-hydroksi suojataan tert-butyylidimetyylisily-

likloridilla ja atsidiryhmä tuodaan mukaan saattamalla reagoimaan natriumatsidin kanssa. Atsidifunktionaalisuus muutetaan tehokkaasti tarvittavaksi amiiniksi pelkistyksellä, jossa käytetään 10-prosenttista palladoitua hiiltä vetyilmakehässä tai Raneyn nikkeli -pelkistysolosuhteissa.

Amiini ja aldehydi liitetään (pelkistävä aminointi) natriumsyaaniboorihydridin läsnäollessa puskuroiduissa olosuhteissa. Oligonukleosididimeeri, jossa on nukleosidien välinen C-C-N-sidos, muodostuu hyvällä saannolla. Oligonukleosidi saatetaan reagoimaan trifluorietikkahappoanhydriditrietyyliamiinin kanssa sekundäärisen alifaattisen typen suojaamiseksi. Suojattu oligonukleosidi desilyloidaan tetrabutyyliammoniumfluoridin kanssa ja tuloksena olevan diolin primäärinen hydroksyyli-ryhmä suojataan selektiivisesti dimetoksitrietyylikloridilla. Jäljellä oleva sekundäärinen hydroksyyli muutetaan tarvittavaksi fosforamiditiksi saattamalla reagoimaan 2-syaanietyyli-N,N-diisopropyylikloorifosforamiditiin kanssa.

Oligonukleosidit, joita yhdistää nukleosidien välinen kahden hiili- ja yhden typpi-atomin muodostama liitos muotoa N-C-C, syntetisoidaan niin että nukleosidit, joissa on aldehydi- ja amiinifunktionaalisuuksia 3'- ja vastavasti 5'-kohdissa, saatetaan reagoimaan pelkistävässä olosuhteissa kuten kuviossa 5 havainnollisesti esitetään.

Amiini- ja aldehydikomponentit syntetisoidaan kaupallisesti saatavilla olevista yhdisteistä. Amiini syntetisoidaan 3-atsido-3-deoksitymidinistä (AZT). AZT:n primäärinen hydroksyyli-ryhmä suojataan dimetoksitrietyylikloridilla ja tuloksena oleva atsidi muutetaan regioselektiivisesti tarvittavaksi amiiniksi 10-prosenttisella palladoidulla hiilellä vetyilmakehän läsnäollessa tai Raneyn nikkeliä käyttäen.

Aldehydi syntetisoidaan kaupallisesti saatavilla olevasta 5'-O-dimetoksitrietylytimidiinistä. Trietyloitu tymidiini silyloidaan tert-butyylidimetyylisilyyliklori-

dilla ja trityyliryhmä poistetaan happamissa olosuhteissa. Tuloksena oleva primäärinen hydroksyyli-ryhmä hapetetaan Swernin olosuhteissa, jolloin saadaan aldehydi. Aldehydiä ei eristetä vaan saatetaan heti reagoimaan (karbetoksimetyleni)trifenyyli- fosforaanin kanssa, jolloin saadaan tyydyttymätön esteri. Tyydyttymätön esteri hydrataan regioselektiivisesti 10-prosenttisella palladoidulla hiilellä, jolloin saadaan tyydyttynyt esteri kvantitatiivisella saannolla. Tyydyttynyt esteri muutetaan vuorostaan tarvittavaksi aldehydiksi di-isobutyylialuminiumhydridillä (DIBAL-H) hyvin selektiivisellä tavalla.

Amiini ja aldehydi liitetään natriumsyaaniboorihydridin läsnäollessa puskuroiduissa pelkistävässä aminointiolosuhteissa. Nukleosidien välinen N-C-C-sidos saadaan hyvällä saannolla. Oligonukleosidin sekundäärinen alifaattinen tyyppi suojataan trifluorietikkahappoanhydridillä ja trietyyliamiinilla. Suojattu dimeeri tai korkeampi oligonukleosidisekvenssi desilyloidaan ja tuloksena oleva hydroksyyli muutetaan fosforamidiitiksi 2-syaanietyyli-N,N-di-isopropyli-kloorifosforamidiitilla.

Nukleosididimeerit tai korkeammat oligomeerit, joissa on trialkyyli- siloksyylisuojausryhmiä, konjugoidaan, jolloin muodostuu oligonukleotideja, joilla on mikä tahansa haluttu pituus. Kun ketjun jatkaminen on saatettu loppuun, oligomeerien suojaus poistetaan sinänsä tunnetulla tavalla. Ketjun pidentämiseksi kiinteän faasin syntetisaattorissa, jossa oligomeereja yhdistää fosfaattisidokset, oligomeerien terminaaliset 5'- ja 3'-hydroksyyli-ryhmät funktionalisoidaan soveliaalla tavalla vastaavasti trityloivilla reagensseilla kuten dimetoksitrityylikloridi ja fosforamidiitti.

D. Yhdisteitä, joilla on dioli kummassa jommassa päässä tai molemmissa päissä

Haluttaessa diolit kiinnitetään jompaan kumpaan päähän tai molempiin päihin kiinteän faasin fosforamidiit-

timenetelmän modifikaatiolla. Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, toim. M. J. Gait, sivut 35-81, IRL Press, Washington, D.C. (1984).

Meidän tekemämme kiinteän faasin modifikaation mukaisesti dioli tuodaan oligonukleotidin yhteen päähän tai molempiin päihin menetelmällä, jossa dioli saatetaan reagoimaan alkoksitrityyliyhdisteen kanssa, jolloin muodostuu trityloitu dioli. Dioli on edullisesti glykoli, edullisemmin polyalkyleeniglykoli. Alkoksitrityylireagenssi on edullisesti monometoksitrityylikloridi tai dimetoksitrityylikloridi ja edullisimmin dimetoksitrityylikloridi. Trityloidut diolit saatetaan sitten reagoimaan syaanifosfiinireagenssin kanssa, jolloin muodostuu trityylidiolisyaanifosfiittiyhdiste, jota yhdistettä käytetään fosforamidiittireagenssina (johon tästä lähin viitataan nimellä "diolifosforamidiittireagenssi") tämän keksinnön mukaisen yhdisteiden kiinteän faasin synteessissä.

Kiinteän faasin synteessissä alkuvaihe on nukleosidin kiinnittäminen kiinteään kantajaan, edullisesti kontrolloidun huokoskoon lasikantajaan (CPG). Nukleosidi kiinnitetään edullisesti CPG:hen sukkinaattiliitoksella nukleosidin 3'-hydroksyylikohdassa. Muut keinot nukleosidien kiinnittämiseksi kiinteisiin kantajiin ovat sinänsä tunnettuja. Jotta dioli voitaisiin kiinnittää 3'-päähän, diolifosforamidiittireagenssi voidaan kiinnittää vaihtoehtoisesti kiinteään kantajaan ennen kuin ensimmäinen nukleosidi lisätään. Diolifosforamidiittireagenssi kiinnitetään kiinteään kantajaan käyttämällä sukkinaattia tai muita sidoksia tavalla, joka on analoginen niiden menetelmien kanssa, joita käytetään nukleosidien kiinnittämisessä. Ammattimies ymmärtää helposti keinot, jolla sellaisia menetelmiä voidaan modifioida diolifosforamidiittireagenssien kanssa käytettäväksi. Kiinteään kantajaan voidaan sijoittaa mikä tahansa määrä dioleja ennen kuin ensimmäinen nukleosidi lisätään. Edullisesti käytetään 1 - noin 50

diolia. Siellä missä dioleja kiinnitetään vain 5'-päähän, dioleja ei sijoiteta lainkaan kiinteään kantajaan.

Sen jälkeen kun ensimmäinen nukleosidi tai dioli(t) on kiinnitetty kiinteään kantajaan, ketjun pidentäminen tapahtuu perättäisinä vaiheina, joissa poistetaan 5'-pään hydroksyylin suojausryhmä (funktionalisoitu trityyliryhmä), aktivoidaan 5'-pään hydroksyyli-ryhmä fosforamidiittireagenssin läsnäollessa, se on: 5'-trityylinukleosidi, 3'-fosforamidiitti, reagoimattomiin nukleosideihin muodostetaan "cap"-rakenne ja fosforisidos hapetetaan.

Kiinnitettyjen nukleosidien 5'-kohdan hydroksyylikohdassa oleva suojausryhmä poistetaan hapolla, edullisesti trikloorietikkahapolla.

Aktivoivat reagenssit, joita voidaan käyttää tämän menetelmän mukaisesti, ovat sinänsä tunnettuja. Edullisia aktivoivia reagensseja ovat tetratsoli ja aktivaattorikulta (Beckman Instr. Inc., Palo Alto, CA).

Aktivaatiovaihe tapahtuu lisätyn nukleosidifosforamidiittireagenssin tai diolifosforamidiittireagenssin läsnäollessa, joka jälkimmäinen reagenssi korvaa tavanomaisen synteessimenetelmien nukleosidifosforamidiittireagenssin, kun dioli lisätään polynukleotidin päähän (päihin). Reagoimattomat ketjut saatetaan päätökseen tai niihin lisätään "cap"-rakenne "cap"-rakenteen muodostavilla reagensseilla, kuten etikkahappoanhydridi ja N-metyyli-imidatsoli.

Labiili trivalenttinen fosforisidos hapetetaan, edullisesti jodilla, oligonukleotidin stabiiliksi pentavalentiksi fosfodiesterisidokseksi.

Sen jälkeen kun haluttu oligonukleotidin ketju on koottu täydellisesti, fosfaattisuojausryhmät poistetaan, ketjut erotetaan kiinteästä kantajasta ja emästä suojaavat ryhmät poistetaan sinänsä tunnetulla tavalla. Gaits, yllä, 67-70.

Ammattimiehet ymmärtävät, että muita oligonukleotidien synteesikeinoja voidaan modifioida vastaavalla tavalla, kun halutaan tuottaa diolipäätteisiä "antisense"-oligonukleotideja.

5 Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet ovat hyödyllisiä kun halutaan hoitaa nisäkkäitä, joilla on perinnöllisiä häiriöitä, tai tauteja, jotka liittyvät muuttuneisiin geneettisiin ekspressiomekanismeihin. Tällä hetkellä koetaan kehittää "antisense"-terapioiden virusinfektioiden
10 hoitoa varten, kuten HIV, sytomegalovirus, herpes simplex, hepatiitti B, papilloomavirus ja pikornavirus; keuhko-, paksusuoli-, kohdunkaula-, rinta- ja munasarjasyöpä; tulehdussairaudet, ja immuunijärjestelmän sairaudet kuten immuunikato (AIDS), hematologinen neoplasma ja hyperproli-
15 feratiiviset häiriöt. Armstrong, yllä, 89; Klausner, yllä, 303, 304.

Tämän keksinnön mukaiset koostumukset, jotka ovat hyödyllisiä geeniekspression inhibiittoreina, sisältävät fysiologisesti soveliaita kantajia ja 1) yhdisteitä, jotka
20 sisältävät oligonukleosidisekvenssejä, jotka sisältävät noin 6 - noin 200 emästä, ja joissa on nukleosidien välinen sidos, jolla on kaava -D-D-D-, kuten tässä määritellään, ja niillä on mahdollisesti dioli jommassa kummassa päässä tai molemmissa päissä tai 2) yhdisteitä, jotka si-
25 sisältävät oligonukleotidisekvenssejä, joissa on noin 9 - noin 200 emästä, ja joissa on dioli kummassa jommassa päässä tai molemmissa päissä.

Tämän keksinnön mukaiset koostumukset, jotka ovat hyödyllisiä geeniekspression inhibiittoreina, sisältävät yhden tai useamman tämän keksinnön mukaisen yhdisteen, joka on formuloitu koostumuksiksi yhdessä yhden tai useamman myrkyttömän fysiologisesti soveliaan kantajan, adjuvantin tai vehikkelin kanssa, joihin viitataan tässä yhteisnimityksellä kantajat, parenteraalista injeksiota varten,
30 suun kautta tapahtuvaa antamista varten kiinteässä tai

nestemäisessä muodossa, peräsuolen tai ihon kautta tapahtuvaa antamista varten ja vastaavia varten.

Koostumukset voidaan antaa ihmisille ja eläimille joko suun kautta, peräsuolen kautta, parenteraalisesti (laskimonsisäisesti, lihaksensisäisesti tai ihonalaisesti), intrasisternaalisesti, vaginansisäisesti, vatsaontelonsisäisesti, paikallisesti (jauheina, voiteina tai tip-poina) tai suu- tai nenäsuihkeena.

Koostumukset, jotka ovat soveliaita parenteraalista injektiota varten, voivat sisältää fysiologisesti soveliaita steriilejä vesiliukoisia tai veteen liukenemattomia liuoksia, dispersioita, suspensioita tai emulsioita ja steriilejä jauheita, jotka voidaan muodostaa uudelleen steriileiksi, injektoitavissa oleviksi liuoksiksi tai dispersioiksi. Esimerkkeihin soveliaista vesiliukoisista ja veteen liukenemattomista kantajista, laimennusaineista, liuottimista tai vehikkeleistä kuuluvat vesi, etanoli, polyolit (propyleeniglykoli, polyetyleeniglykoli, glyseroli ja vastaavat), näiden soveliaat seokset, kasviöljyt (kuten oliiviöljy) ja injektoitavissa olevat orgaaniset esterit kuten etyylioleaatti. Sovelias juoksevuus voidaan pitää yllä esimerkiksi käyttämällä päällystettä kuten le-sitiini, pitämällä yllä tarvittava partikkelikoko disper-sioiden tapauksessa, ja käyttämällä pinta-aktiivisia ai-neita.

Nämä koostumukset voivat sisältää myös apuaineita, kuten säilöntä-, kostutus-, emulgointi- ja väliaineita. Mikro-organismien toiminnan ehkäisy voidaan varmistaa eri-laisilla bakteereja ja sieniä tappavilla aineilla, esi-merkiksi parabeenit, klooributanoli, fenoli, sorbiinihappo ja vastaavat. Voi olla myös suotavaa panna mukaan isotoni-sia aineita, esimerkiksi sokereita, natriumkloridia ja vastaavia. Injektoitavissa olevan muodon pitkittynyt imey-tyminen voidaan saada aikaan käyttämällä imeytymistä hi-

dastavia aineita, esimerkiksi alumiinimonostearaattia ja liivatetta.

Haluttaessa, ja tehokkaampaa jakautumista varten, yhdisteet voidaan sisällyttää hidastetusti vapauttaviin tai kohdennettuihin lääkemuotoihin, kuten polymeerimatriisit, liposomit ja mikropallot. Ne voidaan steriloida esimerkiksi suodattamalla bakteereja pidättävän suodattimen läpi tai sisällyttämällä sterilointiaineita steriilien kiinteiden koostumusten muodossa, jotka voidaan liuottaa steriiliin veteen tai johonkin toiseen steriiliin injektoitavissa olevaan väliaineeseen välittömästi ennen käyttöä.

Kiinteisiin annosmuotoihin suun kautta tapahtuvaa antamista varten kuuluvat kapselit, tabletit, pillerit, jauheet ja rakeet. Sellaisissa kiinteissä annosmuodoissa vaikuttava yhdiste sekoitetaan ainakin yhden inertin tavanomaisen apuaineen (tai kantajan) kanssa, kuten natriumsitraatti tai dikalsiumfosfaatti, tai a) täyte- tai lisäaineiden kanssa, kuten esimerkiksi tärkkelykset, laktoosi, sakkarooosi, glukoosi, mannitoli ja piihappo, b) sideaineiden kanssa kuten esimerkiksi karboksimeetyyliselluloosa, alginaatit, liivate, polyvinyylipyrrolidoni, sakkarooosi ja akaasia, c) humektanttien kanssa kuten esimerkiksi glyseroli, d) hajotusaineiden kanssa kuten esimerkiksi agar-agar, kalsiumkarbonaatti, perunan tai tapiokan tärkkelys, algiiniinihappo, tietyt kompleksiset silikaatit ja natriumkarbonaatti, e) liukenemisen hidastajat kuten esimerkiksi parafiini, f) imeytymisen nopeuttajat kuten esimerkiksi kvaternääriset ammoniumyhdisteet, g) kostutusaineet kuten esimerkiksi setyylialkoholi ja glyserolimonostearaatti, h) absorbentit kuten esimerkiksi kaoliini ja bentoniitti, ja i) liukuaineet kuten esimerkiksi talkki, kalsiumstearaatti, magnesiumstearaatti, kiinteät polyetyleeniglykolit, natriumlauryylisulfaatti tai näiden seokset. Kapselien,

tablettien ja pillerien tapauksessa annosmuodot voivat myös sisältää puskuroivia aineita.

5 Samantyyppisiä kiinteitä koostumuksia voidaan myös käyttää täyteaineina pehmeissä ja kovissa liivatekapseleissa käyttämällä sellaisia apuaineita kuten laktoosi tai maitosokeri, samoin kuin molekyylipainoltaan suuria polyetyleeniglykoleja ja vastaavia.

10 Kiinteitä annosmuotoja kuten tabletteja, lääkerakeita, kapseleita, pillereitä ja rakeita voidaan valmistaa päällysteillä ja kuorilla, kuten enteropäällysteet ja muut sinänsä tunnetut. Ne voivat sisältää samentavia aineita ja niiden koostumus voi myös olla sellainen, että ne vapauttavat vaikuttavan yhdisteen tai yhdisteet tietyssä suoliston kohdassa viivästyneellä tavalla. Esimerkkejä käyttökel-
15 kelpoisista matriisikoostumuksista ovat polymeeriset aineet ja vahat.

Vaikuttavat yhdisteet voivat olla myös mikrokapseloidussa muodossa, jos se on soveliaista, yhden tai useamman yllä mainitun apuaineen kanssa.

20 Nestemäisiin annosmuotoihin suun kautta antamista varten kuuluvat fysiologisesti soveliaat emulsiot, liuokset, suspensiot, siirapit ja eliksiirit. Vaikuttavien yhdisteiden lisäksi nestemäiset annosmuodot voivat sisältää alalla yleisesti käytettyjä inerttejä laimennusaineita,
25 kuten vettä tai muita liuottimia, liukoiksi tekeviä aineita ja emulgoivia aineita, kuten esimerkiksi etyylialkoholi, isopropyylialkoholi, etyylikarbonaatti, etyyliase-
taatti, bentsyylialkoholi, bentsyylibentsoaatti, propyleeniglykoli, 1,3-butyleeniglykoli, dimetyyliformamidi, öljy,
30 erityisesti puuvillasiemenöljy, maapähkinäöljy, maisinsituöljy, oliiviöljy, risiiniöljy ja seesamiöljy, glyseroli, tetrahydrofurfuryylialkoholi, polyetyleeniglykolit ja sorbitaanin rasvahappoesterit tai näiden aineiden seokset ja vastaavat.

Sellaisten inerttien laimennusaineiden lisäksi koostumus voi sisältää myös apuaineita kuten kostutusaineita, emulgoivia ja suspensioivia aineita, makeutus-, maku- ja hajusteaineita.

5 Suspensiot voivat sisältää vaikuttavien yhdisteiden lisäksi suspensioivia aineita, kuten esimerkiksi etoksyloituja isostearyylialkoholeja, polyoksietyleenisorbitolia ja sorbitaaniestereitä, mikrokideselluloosaa, alumiinimetahydroksidia, bentoniittia, agar-agaria ja traganttia, tai
10 näiden aineiden seoksia, ja vastaavia.

Peräsuolen kautta tapahtuvia antamisia varten koostumukset ovat edullisesti peräpuikkoja, jotka voidaan valmistaa sekoittamalla tämän keksinnön mukaiset yhdisteet sopivien ei-ärsyttävien apuaineiden tai kantajien kanssa,
15 kuten kaakaovoi, polyetyleeniglykoli tai peräpuikkovaha, jotka ovat kiinteitä normaaleissa lämpötiloissa mutta nestemäisiä ruumiinlämmössä ja näin ollen sulavat peräsuoles-
sa tai vaginan ontelossa ja vapauttavat vaikuttavan komponentin.

20 Annosmuotoihin tämän keksinnön mukaisen yhdisteen paikallista antamista varten kuuluvat lääkevoiteet, jauheet, suihkeet ja hengitettävät lääkkeet. Vaikuttava komponentti sekoitetaan steriileissä olosuhteissa fysiologisesti soveliaan kantajan ja mikä tahansa tarvittavien säilöntäaineiden, puskureiden tai ponneaineiden kanssa tarvittaessa. Silmäformulaatioiden, silmävoiteiden, jauheiden ja liuosten ajatellaan myös kuuluvan tämän keksinnön suo-
25 japiiriin.

Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet voidaan myös antaa liposomien muodossa. Liposomit johdetaan sinänsä tunnetulla tavalla fosfolipideistä tai muista lipidiai-
30 neista. Liposomit muodostuvat yksi- tai monikerroksisista hydratoiduista nestekiteistä, jotka dispergoidaan vesipitoiseen väliaineeseen. Voidaan käyttää mitä tahansa myrky-
35 töntä, fysiologisesti soveliaista ja metaboloitavissa ole-

vaa lipidiiä, joka kykenee muodostamaan liposomeja. Nämä koostumukset liposomimuodossa voivat sisältää lipoksi-
 genaasin lisäksi tämän keksinnön mukaisia inhibiittoriyh-
 disteitä, stabiloijia, säilöntäaineita, apuaineita ja vas-
 5 taavia. Edulliset lipidit ovat fosfolipidejä ja fosfati-
 dyylikoliineja (lesitiinejä), sekä luonnollisia että syn-
 teettisiä.

Liposomien muodostusmenetelmät ovat sinänsä tunnet-
 tuja. Katso esimerkiksi Methods in Cell Biology, toim.
 10 Prescott, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y., s.
 33 ynnä seuraavat, (1976).

Tämän keksinnön mukaisissa koostumuksissa vaikut-
 tavan aineen todelliset annostasot voivat vaihdella niin,
 että saadaan se vaikuttavan aineen määrä, jolla saadaan
 15 tehokkaasti haluttu terapeuttilinen responssi tiettyä koos-
 tumusta ja antotapaa silmälläpitäen. Valittu annostaso
 riippuu näin ollen halutusta terapeuttilisesta vaikutukses-
 ta, antoreitistä, halutusta hoidon kestoajasta ja muista
 tekijöistä.

20 Tämän keksinnön yhdisteiden maksimivuorokausiannos,
 joka annetaan isännälle kerta-annoksina tai jaettuina an-
 noksina voi olla esimerkiksi sellaisia määriä kuin noin 1
 nanomooli - noin 5 mikromoolia per ruumiinpainokilogramma.
 Annosyksikkökoostumukset voivat sisältää sellaisia määriä
 25 tai sellaisia niiden murtoosia, joita voidaan käyttää vuo-
 rokausianoksen muodostamiseen. Ymmärretään kuitenkin,
 että spesifinen annostaso kenelle tahansa tietylle poti-
 laalle riippuu monista tekijöistä, mukaanlukien ruumiin-
 paino, yleinen terveydentila, sukupuoli, ruokavalio, an-
 toaika ja antoreitti, imeytymis- ja erittymisnopeudet,
 30 yhdistelmät muiden lääkkeiden kanssa ja tietyn hoidettavan
 taudin vaikeus.

Seuraavat esimerkit havainnollistavat lisäksi kek-
 sinnön parasta suoritustapaa eikä niiden ole tarkoitus

rajoittaa patenttihakemusta ja patenttivaatimuksia millään tavalla.

Esimerkki 1

5 5-0'-dimetoksitrityyli-3-0'-t-butyylidimetyylisilyylitymidiinin valmistus

Dimetoksitrityylylitymidiini (5,0 g, 9,2 mmol) ja imidatsoli (1,2 g, 18,4 mmol) liuotettiin 15 ml:aan vedetöntä dimetyyliformamidia (DMF) ja lisättiin tert-butyylidimetyylisilyylikloridiin (1,7 g, 11,5 mmol).

10 Reaktioliuosta sekoitettiin 4 tuntia huoneenlämpötilassa, laimennettiin etyyliasetaatilla ja pestiin vedellä, kylläisellä natriumkloridilla ja kuivattiin natriumsulfaattilla. Saatiin kvantitatiivinen saanto otsikon yhdistettä.

15 Esimerkki 2

3'-0-t-butyylidimetyylisilyylitymidiinin valmistus

5-0'-dimetoksi-3'-0-t-butyylidimetyylisilyylitymidiiniä, joka oli valmistettu esimerkin 1 mukaisen menetelmän mukaisesti (0,7 g, 1,1 mmol) käsiteltiin 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa 13 ml:lla 3-prosenttista trikloorietikkahappoa metyleenikloridiliuoksessa. Reaktioseos neutraloitiin sitten 5-prosenttisella (w/v) natriumbikarbonaattiliuoksella. Orgaaninen kerros kuivattiin natriumsulfaattilla. Otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena 0 - 30 -prosenttinen etyyliasetaattigradien-
25 tigradien- metyleenikloridissa. Reaktion saanto oli 85 %.

Esimerkki 3

30 3'-0-t-butyylidimetyylisilyylitymidiini-4'-aldehydin valmistus

Hyvin sekoitettuun kuivaan metyleenikloridiliuokseen (-78 °C) lisättiin oksalyylikloridia (33,0 mmol, 2,88 ml), jota seurasi DMSO:n lisäys tipoit-
35 tain (3,12 ml, 4,4 mmol). 10 minuutin jälkeen alkoholi (5,6 g, 15,7 mmol), joka oli valmistettu esimerkin 2 mukaisesti,

20,0 ml:ssa CH_2Cl_2 :ta, lisättiin tipoittain 2 minuutin aikana ja sekoittamista jatkettiin 45 minuuttia. Et_3N (8,1 ml, 58,1 mmol) lisättiin ja sekoittamista jatkettiin vielä 45 minuuttia. Reaktioseos tuotiin sitten huoneen-

5 lämpötilaan ja pestiin sitten vedellä (2 x 10 ml), jota seurasi suolavesi (10 ml) ja kuivattiin (Na_2SO_4). Epäpuhdasta aldehydiä käytettiin seuraavassa vaiheessa.

Esimerkki 4

5'-vinyyli-5'-deoksi-3'-t-butyylidimetyyllisilyyli- 10 deoksitymidiinin valmistus

Metyylitrifenyylifosfoniumbromidin (0,7 mmol) liuokseen kuivassa tetrahydrofuraanissa (THF) (0 °C) lisättiin natriumbis(trimetyyllisilyyliamidi)liuos (0,6 mmol) tipoittain. 30 minuutin kuluttua vastaavan 4'-aldehydin

15 liuos THF:ssä lisättiin tipoittain typen alla. Reaktioseosta sekoitettiin 2 tunnin ajan, laimennettiin etyyliasetaatilla, pestiin vedellä, sitten suolavedellä ja kuivattiin (Na_2SO_4). Otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena 20-prosenttinen etyyliasetaatihexaani. Saanto oli 55 - 60 %.

20

Esimerkki 5

3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-deoksi-5'-hydroksimetyylitymidiini

2-molaariseen 2-metyyli-2-buteeniliuokseen (1,6 eq, 1,5 ml, 3 mmol) 3 ml:ssa vedetöntä THF:ää (0 °C) lisättiin hitaasti typen alla 1,6 ekvivalenttia 1-molaarista boraa-

25 ni-tetrahydrofuraanikompleksia (3 ml, 2 mmol).

Liuosta sekoitettiin 10 minuutin ajan, jota seurasi esimerkin 4 mukaisesti valmistetun vinyylitymidiinin li-

30 säys (0,7 g, 1,9 mmol) 5 ml:ssa vedetöntä THF:ää. Reaktioseosta sekoitettiin 45 minuuttia ja se sijoitettiin jääkaappiin kahdeksi päiväksi.

Eristys tehtiin käyttämällä vesiliuosta, joka sisälsi 3,1 eq 2-molaarista natriumhydroksidia ja 3,1 eq

35 30-prosenttista vetyperoksidia (edullisesti lisäämällä

vetyperoksidi tipoittain natriumhydroksidin vesiliuokseen 0 °C:een lämpötilassa ja sekoittamalla 10 minuuttia). Liuos lisättiin hitaasti lisäyssuppilon läpi reaktioseokseen 0 °C:een lämpötilassa, sekoitettiin 1 tunnin ajan, poistettiin jäähauteesta, laimennettiin etyyliasetaatilla, pestiin vedellä, kylläisellä natriumkloridilla ja kuivatettiin natriumsulfaattilla. Otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena etyyliasetaatin 20 - 80 -prosenttinen gradientti heksaanissa. Saanto oli 62 %.

10 **Esimerkki 6**

5'-jodimetyyli-5'-deoksi-3'-O-t-butyylidimetyyllisilyylitymidiinin valmistus

3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-deoksi-5'-hydroksimetyyllitymidiinin liuokseen, joka oli valmistettu esimerkin 5 menetelmän mukaisesti (0,3 g, 0,9 mmol) kuivassa asetonitriilissä (5 ml) ja eetterissä (3,4 ml) lisättiin 3 eq trifenyylifosfiinia (0,7 g, 2,8 mmol), 4 eq imidatsolia (0,3 g, 3,7 mmol) ja 2,2 eq jodia (0,5 g, 2,8 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 45 minuutin ajan ja liuotin haihdutettiin. Etyyliasetaatia lisättiin tähteeseen ja tähte pestiin vedellä, kylläisellä natriumkloridilla ja kuivatettiin natriumsulfaattilla. Otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena etyyliasetaatin 30 - 50 -prosenttinen gradientti heksaanissa. Saanto oli 90 %.

25 **Esimerkki 7**

3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-deoksi-5'-tymidyyylimetyyllifosfoniumjodidin valmistus

5'-jodimetyyli-5'-deoksi-3'-O-t-butyylidimetyyllisilyylitymidiinin sekoitettuun liuokseen, joka oli valmistettu esimerkin 6 mukaisesti (480 mg, 1 mmol) kuivassa CH₃CN:ssä (5 ml) lisättiin trifenyylifosfiinia (1,57 g, 6 mmol) ja seosta palautusjäähdytettiin 12 tuntia 90 °C:een lämpötilassa. Reaktio jäähdytettiin ja liuotin poistettiin. Otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromato-

grafiassa, ajoliuoksena 5-prosenttinen MeOH CH₂Cl₂:ssa. Tuote saatiin 95 - 96 -prosenttisella saannolla.

Esimerkki 8

5'-t-butyylidimetyyllisilyyli-3'-deoksi-3'-(1",2"-dihydroksi-3"-propyyli)-tymidiini

Osmiumtetraoksidi (OsO₄) (4 tippaa, 2,5 w/w %) butanolissa lisättiin 3'-(2"-propenyli)-3'-deoksi-5'-O-t-butyylidimetyyllisilyylitymidiinin sekoitettuun seokseen, joka oli valmistettu kuvatus menetelmän mukaan, J. Org. Chem. 1989, 54:2767-2769 (C.K. Chu ym.) (183 mg, 0,5 mmol) ja 4-metyylimorfoliini-N-oksidi (53 mg, 0,45 mmol) 5,0 ml:ssa vedetöntä THF:ää 0 °C:een lämpötilassa. Reaktioseos sammutettiin sitten 10-prosenttisella natriummetabisulfiitin vesiliuoksella (2,0 ml), sekoitettiin 20 minuutin ajan, suodatettiin piidioksidikerroksen läpi ja laimennettiin etyyliasetaatilla (25,0 ml). Orgaaninen faasi pestiin vedellä (5,0 ml) ja suolavedellä, ja kuivatettiin sitten Na₂SO₄:llä. Liuotin haihdutettiin ja otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatografiassa.

Esimerkki 9

5'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-3'-deoksi-tymid-3'-yyli-asetaldehydin valmistus

Natriumperiodaatti (214 mg, 1 mmol) lisättiin tymidiinidiolin, joka oli valmistettu esimerkin 2 menetelmällä (200 mg, 0,5 mmol), sekoitettuun liuokseen THF-H₂O:ssa (4:1-suhde, 5,0 ml). 1 tunnin kuluttua reaktioseos laimennettiin etyyliasetaatilla (25 ml), pestiin H₂O:lla (2 x 5 ml), suolavedellä ja kuivatettiin. Otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatografiassa 70-prosenttisella etyyliasetaatilla heksaanissa.

Esimerkki 10

Sellaisten tymidiinidimeerien valmistus, joissa on kolmihiilinen nukleosidien välinen sidos

Esimerkin 10a - 10e menetelmät esitetään havainnollisesti kuviossa 3.

10a. Fosfoniumjodidiyhdisteen, joka oli valmistettu esimerkin 7 menetelmän mukaisesti, sekoitettuun suspensioon (241 mg, 0,326 mmol) kuivassa THF:ssä (2,0 ml) lisättiin kalium-tert-butoksidia (0,62 ml, 1,0-molaarinen liuos THF:ssä, 0,62 mmol), -78 °C:een lämpötilassa typen alla. 20 minuutin jälkeen lisättiin 3'-asetaldehydiyhdiste, joka oli valmistettu esimerkin 9 menetelmän mukaisesti (80 mg, 0,22 mmol). 60 minuutin kuluttua reaktioseos laimennettiin etyyliasetaatilla (30 ml), pestiin vedellä (2 x 5 ml) ja suolavedellä (5 ml) ja kuivattiin (Na_2SO_4). Liuotin haihdutettiin ja olefiinituote (yhdiste 1) puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena 70-prosenttinen etyyliasetaatti heksaanissa. Saanto oli alueella 55 - 60 %.

10b. 10-prosenttinen Pd-C (20 mg) lisättiin yhdisteen 1 (109 mg) sekoitettuun liuokseen metanolissa (5,0 ml) 25 °C:een lämpötilassa ja vedyn 1 ilmakehän paineessa. 4 tunnin kuluttua katalysaattori suodatettiin Celite-kerroksen läpi ja liuotin haihdutettiin. Yhdiste 2 saatiin täten talteen ja puhdistettiin sitten flash-kromatografiassa, ajoliuoksena 80-prosenttinen etyyliasetaatti heksaanissa.

10c. Noin 2,8 ekvivalenttia tetrabutyyliammoniumfluoridia 0 °C:een lämpötilassa lisättiin yhdisteen 2 sekoitettuun liuokseen (350 mg) 5,0 ml:ssa THF:ää. 3 tunnin kuluttua liuotin haihdutettiin ja yhdiste 3 puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena 10-prosenttinen metanoli CH_2Cl_2 :ssa.

10d. Noin 0,05 ekvivalenttia 4-dimetyyliaminopyridiiniä, 1,4 ekvivalenttia trietyyliamiinia ja 1,2 ekvivalenttia 4,4'-dimetoksitrietylikloridia lisättiin yhdisteen 3 sekoitettuun liuokseen (0,6 mmol) kuivassa pyridiinissä (4,0 ml). 2 tunnin kuluttua reaktioseos sammutettiin 2,0 ml:lla vettä ja laimennettiin sitten 2,0 ml:lla etyyliasetaattia. Orgaaninen faasi erotettiin, pestiin suola-

vedellä ja kuivattiin. Yhdiste 4 puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena 5-prosenttinen metanoli metyleenikloridissa.

- 5 10e. Noin 2,0 ekvivalenttia di-isopropyylietyyliamiinia ja 1,0 ml kuivaa dikloorimetaania (CH_2Cl_2) lisättiin yhdisteen 4 sekoitettuun liuokseen (0,5 mmol). 30 minuutin kuluttua 0,75 ekvivalenttia 2-syaanietyyli-N,N-di-isopropyylikloorifosforamidiittia lisättiin tipoitain 20 minuutin aikana ja sekoitusta jatkettiin vielä 1 tunti.
- 10 Liuotin haihdutettiin sitten ja yhdiste 5 puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena etyyliasetaatti (joka oli 1-prosenttinen trietyyliamiinin suhteen) typpi-ilmakässä.

- 15 Vaiheiden a-d mukaisia prosesseja yllä käytetään tehtäessä dimeerejä, jotka sisältävät kolmihiilisiä nukleosidien välisiä sidoksia, joissa jokaisella kolmella hiilellä on kaava $-\text{CH}_2-$.

- 20 Mitä tahansa hiiltä tai kaikkia hiiliä voidaan mahdollisesti hydroksyloida modifioimalla menetelmää, joka on esitetty havainnollisesti kuviossa 3, seuraavalla tavalla. Tippa 2,5-prosenttista (w/v) osmiumtetraoksidin liuosta t-butanolissa 0 °C:een lämpötilassa lisättiin yhdisteen 1 ja 4-metyylimorfoliini-N-oksidin (9,1 mg) sekoitettuun liuokseen 0,8 ml:ssa THF:ää. Reaktioseosta pidettiin
- 25 0 °C:een lämpötilassa 24 tuntia, sammutettiin natriummatabsulfiitin vesiliuoksella, laimennettiin etyyliasetaatilla ja pestiin vedellä ja suolavedellä. Liuotin haihdutettiin ja tuloksena oleva hydroksyloitu dimeeri puhdistettiin ohutkerroskromatografiassa käyttämällä eluenttina etyyliasetaattia. Hydroksyloitu dimeeri suojataan sitten ja 5'- ja 3'-päätt muokataan kuten vaiheissa b - d yllä.
- 30

Esimerkki 11

Nukleosidien välisten kolmihiilisten hydroksyloitujen sidosten valmistus

Vaiheiden a - d tuottamia tymidiinidimeerifosforamidiittiyhdisteitä käytettiin modifioidussa kiinteän faasin fosforamidiitti-synteettisessä menetelmässä, jotta saatiin tehtyä taulukon 1 oligonukleosidisekvenssit.

Oligodeoksinukleotidit syntetisoitiin 3'-päästä 5'-päähän.

10

Taulukko 1

Sekvenssi

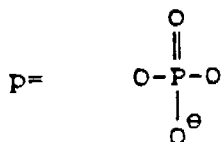
Viitekoodi

5' TpTpTpTpTp[TcT]pTpTpTpypypT 3' 1
 5' TpTpTpTpTpTpTp[TcT]pTpTpypypT 3' 2
 5' TpTpTpTpTpTpTpTp[TcT]pyypT 3' 3

15

T= tymidiini

20



25

c = -CH₂-CH₂-CH₂-

Y= tetraetyleeniglykoli

30

Synteesi eteni sitten modifioidun fosforamidiittimenetelmän mukaisesti. Kiinnitetyn tymidiinin 5'-hydroksyyli-ryhmä saatettiin reagoimaan trikloorietikkahapon kanssa, jotta 5'-hydroksyyli-ryhmän suojaus saatiin poistettua. Tämän suojauksenpoistovaiheen jälkeen kiinnitetty tymidiini saatettiin reagoimaan aktivoivan agenssin, tetratsolin, ja dimetoksitrietyylitetraetyleeniglykolisyaanifosfiinia sisältävän fosforamidiittireagenssin kanssa.

35

Aktivaatiovaihetta seurasi "cap"-rakenteiden lisääminen reagoimattomiin 5'-hydroksyyli-ryhmiin etikkahappoanhydridillä ja N-metyyli-imidatsolilla. Fosforisidos hapetettiin sitten jodilla sinänsä tunnetulla tavalla. Sekvensseissä 1 ja 2, jotka sisältävät kaksi tetraetyleeniglykolitähdettä (TEG), suojauksenpoistovaiheet, aktivointivaiheet, "cap"-rakenteiden lisäysvaiheet ja hapetusvaiheet toistettiin kuten yllä on kuvattu.

Ketjun pidentäminen eteni sitten standardinomaisin peräkkäisin suojauksenpoisto-, aktivointi-, "cap"-rakenteen lisäys- ja hapetusvaihein sillä muutoksella että ketjuun lisättiin aktivointivaiheessa haluttaessa kolmella hiilellä kytketty tymidiinidimeeri, joka oli valmistettu esimerkkien 1 - 9 mukaisten menetelmien mukaisesti.

Ketjun koostamisen lopussa tymidiinioligomeerit poistettiin CPG-kantajasta väkevällä ammoniumhydroksidillä. Liuosta käsiteltiin sitten vielä 55 °C:n lämpötilassa 8 - 15 tuntia kaikkien suojausryhmien poistamiseksi emästen eksosyklisistä amiineista.

Esimerkki 12

3'-O-asetyyli-5'-karbometoksimetyyli-5'-deoksitymidiinin valmistus

Noin 0,39 g natriumboorihydridiä lisättiin kylmässä (jäähaude) sekoitettuun 3'-O-asetyyli-5'-karbometoksimetyyleeni-5'-deoksitymidiinin (3,17 g) seokseen isopropanolissa (95 ml). Seosta sekoitettiin 0 °C:n lämpötilassa typpi-ilmakehässä puolen tunnin ajan, sitten huoneenlämpötilassa vielä neljän ja puolen tunnin ajan.

Jäähdytetty seos sammutettiin 20 ml:lla metanolia, jota seurasi 30 minuutin aikana 200 ml tislattua vettä, ja uutettiin sitten useilla annoksilla etyyliasetaatia. Yhdistetyt orgaaniset uutteen käsiteltiin suolavedellä ja kuivattiin vedettömällä magnesiumsulfaatilla. Kuivausaine suodatettiin pois ja liuotin haihdutettiin, mikä tuotti otsikon yhdisteen jäännöslasina (2,7 g).

Esimerkki 13**5'-karbometoksimetyyli-5'-deoksitymidiinin valmistus**

Noin 10 tippaa 25-prosenttista (w/v) natriummetoksidiliuosta metanolissa lisättiin kylmään, sekoitettuun 3'-O-asetyyli-6'-karbometoksimetyyli-5'-deoksitymidiiniliuokseen (2,22 g), joka oli valmistettu esimerkin 12 menetelmän mukaisesti, noin 300 ml:ssa kuivaa metanolia (viety neutraalin alumiinioksidikerroksen läpi). Seosta sekoitettiin typpi-ilmakehän alla jäähaudetta täydentämättä noin 20 tunnin ajan.

Pieni määrä kationinvaihtohartsia (Bio-Rad AG 50WX8) lisättiin ja seosta sekoitettiin 30 minuutin ajan. Liuotin poistettiin alipaineessa, mikä tuotti 2,1 g jäännöslasia, joka käsiteltiin lämpimällä tolueenilla ja jäädytyksen jälkeen suodatettiin ja huuhdottiin sykloheksaanilla, jolloin saatiin epäpuhdas tuote valkoisena kiinteänä aineena, 1,64 g.

Otsikon yhdiste puhdistettiin edelleen pienestä määrästä lähtömateriaalia piidioksidigeelikromatografiasa, eluoimalla etyyliasetaatilla, sitten jälleenkiteyttämällä etyyliasetaatti/heksaanista, jolloin saatiin valkoisia kiteitä.

Esimerkki 14**3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-(2"-hydroksietyyli)-tymidiinin valmistus**

Noin 19 ml 1-molaarista di-isobutyylialumiinihydriidiä tetrahydrofuraanissa (THF) lisättiin kylmään (-40 °C - -30 °C), sekoitettuun liuokseen, jossa oli 1,88 g 3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-karboetoksimetyyli-5'-deoksitymidiiniä 40 ml:ssa vedetöntä THF:ää, typpi-ilmakehässä. Reaktiolämpötila nostettiin sitten hitaasti -20 °C:een lämpötilaan.

Seos sammutettiin noin 3,5 ml:lla metanolia ja reaktiolämpötila nostettiin -10 °C:een. Noin 18 ml vettä

36 ml:ssa THF:ää lisättiin lämpimään seokseen ja lämpötilaa nostettiin vielä 10 °C:een. Suurin osa THF:stä poistettiin alipaineella ja jäännös laimennettiin noin kahdella tilavuudella vettä. Vesifaasi uutettiin useita kertoja etyyliasetaatti/kloroformilla. Yhdistetyt uutteen pestiin kylmällä 2-normaalisella suolahapolla ja suolavedellä, kuivattiin vedettömällä magnesiumsulfaatilla ja suodatettiin. Liuotin poistettiin suodoksesta alipaineella, jolloin saatiin otsikon yhdiste (noin 1,6 g).

10 Esimerkki 15

3'-O-t-butyylidimetyylisilyyli-5'-(2"-jodietyyli)-5'-deoksitymidiinin valmistus

Noin 1 g p-tolueenisulfonyylikloridia lisättiin liuokseen, jossa oli 1 g 3'-O-t-butyylidimetyylisilyyli-5'-(2"-hydroksietyyli)-5'-deoksitymidiiniä, joka oli valmistettu esimerkin 14 menetelmän mukaisesti, 25 - 30 ml:ssa vedetöntä pyridiiniä, ja seosta pidettiin tulpan alla noin 5 °C:n lämpötilassa noin 19 tuntia.

Seos lisättiin noin 200 ml:aan jäävettä ja uutettiin useita kertoja eetterillä. Yhdistetyt orgaaniset uutteen pestiin kylmällä 2-normaalisella suolahapolla, vedellä ja suolavedellä. Pestyt uutteen kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla ja suodatettiin. Liuotin poistettiin suodoksesta alipaineella, jolloin saatiin 1,24 g p-tolueenisulfonyyli johdannaisen jäännöslasia.

Noin 0,54 g p-tolueenisulfonyyli johdannaista ja 0,38 g natriumjodidia liuotettiin 55 ml:aan kuivaa (molekyyliseulat, 4A) asetonia kolmeksi päiväksi, jota seurasi vielä natriumjodidin lisäys (0,19 g) sekoittaen viimeisenä päivänä.

Reaktiotuote suodatettiin ja liuotin haihdutettiin, jolloin saatiin epäpuhtas tuote.

Epäpuhtas tuote puhdistettiin piidioksidigeelikromatografiassa (85 g), eluoimalla 25-prosenttisellä etyyliasetaatilla heksaanissa. Liuotin haihdutettiin, jolloin

saatiin 0,4 g haluttua 3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-(2"-jodietyyli)-5'-deoksitymidiiniä.

Esimerkki 16

5'-karbometoksimetyyleeni-5'-deoksitymidiinin valmistus

Noin 10 tippaa 25-prosenttista natriummetoksidia metanolissa lisättiin sekoitettuun liuokseen, jossa oli 1,5 g 3'-O-asetyyli-5'-karbometoksimetyyleeni-5'-deoksitymidiiniä 150 ml:ssa kuivaa metanolia (viety neutraalin alumiinioksidikerroksen läpi). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa typpi-ilmakehässä vielä 6 tuntia.

Pieni määrä kationinvaihtohartsia (Bio-Rad AG-50W-X8) lisättiin seokseen sekoittaen 10 minuutin aikana. Liuotin poistettiin alipaineessa, jolloin saatiin valkoinen kiinteä jäännös (1,3 g). Jäännös trituroitiin kahdesti lämpimällä tolueenilla ja sitten se pantiin kuumaan etanoliin, suodatettiin ja jäädytettiin, jolloin otsikon yhdiste saatiin kuivatuksen jälkeen valkoisena kiteisenä tuotteena, 0,85 g.

20 Esimerkki 17

3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-(2"-hydroksietyyleeni)-5'-deoksitymidiini

Liuos, jossa oli 296 mg 5'-karbetoksimetyyleeni-5'-deoksitymidiiniä, lisättiin tipoitain typpi-ilmakehässä kylmään (jäävesihaude), sekoitettuun liuokseen, jossa oli 205 mg imidatsolia ja 227 mg t-butyylidimetyyllisilyylikloridia 1 ml:ssa vedetöntä dimetyyliformamidia. Täydellisen addition jälkeen seos poistettiin jäältä ja sekoitusta jatkettiin huoneenlämmössä kaksi tuntia, sitten 35 °C:een lämpötilassa vielä kaksi tuntia ja lopuksi 40 °C:een lämpötilassa puoli tuntia.

Seos sammutettiin sitten 2 ml:lla metanolia, jota seurasi kahdesta kolmeen tilavuutta vettä. Vesifaasi uutettiin useita kertoja etyyliasetaatilla. Yhdistetyt orgaaniset uutteet pestiin vedellä, kylläisellä bikarbonaat-

tiliuoksella ja suolavedellä, kuivattiin vedettömällä magnesiumsulfaatilla ja suodatettiin. Liuotin poistettiin suodoksesta alipaineella, jolloin saatiin 0,40 g 3'-O-t-butyylidimetyylisilylyyli-5'-karbometoksimetyyleeni-5'-deoksitymidiiniä.

Noin 4 ml di-isobutyylialumiinihydridin 1-molaarisesta liuosta tetrahydrofuraanissa lisättiin tipoittain jäähdytettyyn liuokseen (-30°C - -35°C), jossa oli 0,37 g 3'-O-t-butyylidimetyylisilylyyli-5'-karbometoksimetyyleeni-5'-deoksitymidiiniä, joka oli liuotettu 10 ml:aan vedetöntä tetrahydrofuraania lämpötilassa, joka oli alle -30°C . Sen jälkeen kun additio oli täydellinen, reaktiota sekoitettiin typpi-ilmakehässä vielä kaksi tuntia, samalla kun sisäinen lämpötila pidettiin alueella noin -30°C - noin -20°C .

Noin 0,8 ml metanolia lisättiin reaktioseokseen, jota seurasi liuoksen lisäys, jossa oli 4 ml vettä 8 ml:ssa tetrahydrofuraania. Suurin osa haihtuvammasta tetrahydrofuraanista poistettiin alipaineessa. Vesiliukoinen tähde laimennettiin noin kahdesti tilavuudellaan vettä ja uutettiin useita kertoja etyyliasetaatilla. Yhdistetyt orgaaniset uutteen pestiin kylmällä 1-normaalisisällä suolahapolla ja suolavedellä, kuivattiin vedettömällä magnesiumsulfaatilla ja suodatettiin. Suodos haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin otsikon yhdiste jäännöksenä, 0,267 g.

Osa tästä materiaalista puhdistettiin analyttiseen puhtauteen piidioksidigeelikromatografiassa eluoimalla 50-prosenttisellä etyyliasetaatti/heksaanilla.

Esimerkki 18

Sellaisten tymidiinidimeerien valmistus, jotka sisältävät nukleosidien välisen, kahden hiiliatomin ja yhden happiatomin (3'-O-C-C-5') muodostaman sidoksen

5

18a. 5'-O-trityylitymidiinin sekoitettuun liuokseen lisätään yhtä suuri molaarinen määrä sekä emästä että 3'-O-t-butyylidimetyylisilyyli-5'-(2"-jodietyyli)-5'-deoksitymidiiniä 0 °C:n lämpötilassa. Reaktion kulkua monitoroidaan ohutkerroskromatografiassa (TLC). Sen jälkeen kun reaktio on saatettu loppuun, haluttu dimeeri eristetään ja puhdistetaan flash-kromatografiassa.

10

18b. 3'-O-t-butyylidimetyylisilyyli-5'-(2"-hydroksietyyli)-5'-deoksitymidiinin sekoitettuun liuokseen, jota pidetään noin -5 °C:n lämpötilassa, lisätään 2 ekvivalenttia emästä ja liuotin haihdutetaan kuivaksi. Jäännös kiteytetään uudelleen DMF:ään ja lisätään ekvivalentti 5'-dimetoksitrityyli-2',3'-syklotymidiinia. Reaktioseos kuumennetaan noin 40 °C:een lämpötilaan ja halutun dimeerin muodostusta monitoroidaan TLC:llä. Sen jälkeen kun reaktio on saatettu loppuun, haluttu dimeeri eristetään ja puhdistetaan flash-kromatografiassa.

15

20

Esimerkki 19

Esimerkin 18 dimeerin 3'-pään suojauksen poisto

25

Suojattujen dimeerien 3'-t-butyylidimetyylisilyyli-suojausryhmä poistetaan käsittelemällä esimerkin 18 mukaisen dimeerin THF-liuos 2,8 ekvivalentilla tetrabutyyliammoniumfluoridia 0 °C:n lämpötilassa. Sen jälkeen kun reaktio on saatettu loppuun (yleensä noin 3 tuntia) liuos haihdutetaan ja haluttu dimeeri eristetään ja puhdistetaan flash-kromatografiassa.

30

Esimerkki 20

Sellaisen funktionalisoidun dimeeriyksikön valmistus, joka soveltuu automatisoituun synteisiin

Esimerkin 19 dimeerituote liuotetaan dikloorimetaaniin ja 2 ekvivalenttia di-isopropyylietyyliamiinia lisätään. Seosta sekoitetaan 30 minuuttia, jota seuraa 2-syanaetyyli-N,N-di-isopropyylikloorifosforamidiitin 0,75 ekvivalentin tipoittainen lisääminen noin 20 minuutin ajan. Sekoittamista jatketaan vielä tunti, liuotin haihdutetaan ja tuloksena oleva funktionalisoitu dimeeri eristetään ja puhdistetaan flash-kromatografiapylväässä, ajoliuoksena etyyliasetaatti inertissä ilmakehässä.

Esimerkki 21

5'-t-butyylidimetyyllisilyyli-3'-deoksi-3'-(1",2"-dihydroksi-3"-propyyli)-tymidiini

Osmiumtetraoksidi (OsO_4) (4 tippaa, 2,5 % w/v) butanolissa lisättiin 3'-(2"-propenyli)-3'-deoksi-5'-O-t-butyylidimetyyllisilyylitymidiinin (183 mg, 0,5 mmol), joka on valmistettu kirjallisuuden menetelmän mukaisesti, ja 4-metyylimorfoliini-N-oksidin (53 mg, 0,45 mmol) muodostamaan seokseen kuivassa THF:ssä 0 °C:een lämpötilassa. Reaktioseos sammutettiin sitten 10-prosenttisella natriummetabisulfiitin vesiliuoksella (2,0 ml), jota sekoitettiin 20 minuutin ajan, suodatettiin piidioksidigeelikerroksen läpi ja laimennettiin etyyliasetaatilla (25,0 ml). Orgaaninen faasi pestiin vedellä (5,0 ml) ja suolavedellä ja kuivattiin sitten Na_2SO_4 :llä. Liuotin haihdutettiin ja otikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatografiassa.

Esimerkki 22

3'-deoksi-tymid-3-yyli-asetaldehydi-5'-O-t-butyylidimetyyllisilyylitymidiini

Natriumperiodaatti (214 mg, 1 mmol) lisättiin tymidiinidiolin, joka oli valmistettu esimerkin 21 menetelmällä (200 mg, 0,5 mmol), sekoitettuun liuokseen THF- H_2O :ssa (4:1 suhde, 5,0 ml). 1 tunnin kuluttua reaktioseos

laimennettiin etyyliasetaatilla (25,0 ml), pestiin H₂O:lla (2 x 5,0 ml) ja suolavedellä ja kuivattiin. Otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena 70-prosenttinen etyyliasetaatti heksaanissa.

5 **Esimerkki 23**

5'-o-(p-tolueenisulfonyyli)tymidiinin valmistus

Tymidiinin (20 g, 82,6 mmol) sekoitettuun liuokseen kuivassa pyridiinissä (200 ml) lisättiin p-tolueenisulfonylikloridi (47,2 g, 247,6 mmol) 0 °C:n lämpötilassa typ-
10 pi-ilmakehän alla. 3 tunnin kuluttua reaktioseos kaadettiin jäille ja uutettiin etyyliasetaatilla. Liuotin haihdutettiin ja tuote kiteytettiin etyyliasetaatin ja metanolin seoksesta. Otsikon yhdiste oli valkoinen kiteinen kiinteä aine, joka saatiin 70 - 75 -prosenttisella saan-
15 nolla.

Esimerkki 24

5'-jodi-5'-deoksitymidiinin valmistus

Tymidiinitosylaatin (10,65 g, 26,9 mmol) joka oli valmistettu esimerkin 23 menetelmän mukaisesti, sekoitettuun liuokseen kuivassa asetonissa (75 ml) lisättiin natriumjodidi (10 g, 66,7 mmol) ja seosta palautusjäähdytettiin 16 tuntia. Liuotin haihdutettiin ja laimennettiin etyyliasetaatilla. Orgaaninen faasi pestiin vedellä (2 x 20 ml) ja suolavedellä (10 ml) ja kuivattiin natriumsulfa-
20 faatilla. Otsikon yhdiste kiteytettiin metanolista valkoisena kiteisenä kiinteänä aineena 90 - 95 -prosenttisella saannolla.

Esimerkki 25

3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-jodi-5'-deoksitymidiinin valmistus

Tymidiinijodidin (8,0 g, 24,7 mmol), joka oli valmistettu esimerkin 24 mukaisesti, sekoitettuun liuokseen kuivassa DMF:ssä lisättiin imidatsolia (4,2 g, 61,7 mmol).
5 minuutin kuluttua tert-butyylidimetyyllisilylikloridi
35 (4,47 g, 29,64 mmol) lisättiin ja seosta sekoitettiin 4

tuntia. Reaktioliuos laimennettiin sitten etyyliasetaatilla (250 ml), pestiin vedellä (2 x 100 ml) ja suolavedellä (50 ml) ja kuivattiin sitten natriumsulfaatilla. Otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena

5 60-prosenttinen etyyliasetaatti heksaanissa, 92-prosenttisellä saannolla.

Esimerkki 26

3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-atsidi-5'-deoksitymidiinin valmistus

10 3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-jodi-5'-deoksitymidiinin (10,8 g, 20 mmol) sekoitettuun liuokseen, joka oli valmistettu esimerkin 25 menetelmän mukaisesti, kuivassa DMF:ssä (50 ml) lisättiin natriumatsidia (3,9 g, 60 mmol) ja seosta kuumennettiin 0 °C:n lämpötilassa 12

15 tuntia. Sitten reaktioseos laimennettiin etyyliasetaatilla (200 ml), pestiin vedellä (2 x 50 ml) ja suolavedellä (50 ml) ja sitten kuivattiin natriumsulfaatilla. Otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena 50-prosenttinen etyyliasetaatti heksaanissa, 90-prosenttisellä saannolla.

20

Esimerkki 27

3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-amino-5'-deoksitymidiini

25 Tymidiiniatsidin (5,0 g, 13,1 mmol), joka oli valmistettu esimerkin 26 menetelmän mukaisesti, sekoitettuun liuokseen MeOH:ssa lisättiin 200 mg 10-prosenttista Pd-C:tä typpi-ilmakehässä. Typpikaasu imettiin sitten pois ja korvattiin vedyllä. Pois imemisen ja korvaamisen menettely toistettiin kahdesti ja sekoitusta jatkettiin yhden vety-ilmakehän paineessa 12 tunnin ajan. Vety poistettiin ja katalysaattori suodatettiin Celite-kerroksen läpi ja liuotin poistettiin alipaineessa. Epäpuhtas tuote puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena 5 - 10 -prosenttinen MeOH CH₂Cl₂:ssa, jolloin saatiin otsikon yhdiste

30

35 85 - 87 -prosenttisellä saannolla.

Esimerkki 28**3'-atsido-3'-deoksi-5'-O-dimetoksitrityylylitymidii-
nin valmistus**

3'-atsido-3'-deoksitymidiiin (2,67 g, 10 mmol)
 5 sekoitettuun liuokseen kuivassa pyridiinissä (50 ml) li-
 sätettiin 4-dimetyyliaminopyridiiniä (61 mg, 0,5 mmol), tri-
 etyyliamiinia (1,9 ml, 14 mmol) ja 4,4'-dimetoksitrityyli-
 kloridia (4,1 g, 12 mmol) perättäisessä järjestyksessä.
 3 tunnin kuluttua lisättiin vettä (30 ml) ja uutettiin
 10 etyyliasetaatilla (250 ml). Orgaaninen faasi erotettiin,
 pestiin suolavedellä (50 ml) ja kuivattiin natriumsul-
 faatilla. Otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatogra-
 fiassa, ajoliuoksena 5-prosenttinen metanoli metyleeni-
 kloridissa, 80 - 85 -prosenttisella saannolla.

Esimerkki 29**3'-amino-3'-deoksi-5'-O-dimetoksitrityylylitymidiiin
valmistus**

Tymidiiniatsidin (3,99 g, 40 mmol), joka oli val-
 mistettu esimerkin 28 menetelmän mukaisesti, sekoitettuun
 20 liuokseen MeOH:ssa lisättiin 200 mg 10-prosenttista Pd-
 C:tä argonilmakehässä. Argonkaasu poistettiin alipaineella
 ja vety tuotiin. Tämä menettely toistettiin kahdesti ja
 sekoitusta jatkettiin 1 vetyilmakehän paineessa 12 tunnin
 ajan. Vety poistettiin ja katalysaattori suodatettiin Ce-
 25 lite-kerroksen läpi ja liuotin poistettiin alipaineella.
 Epäpuhdas tuote puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajo-
 liuoksena 5-prosenttinen MeOH metyleenikloridissa, jolloin
 saatiin otsikon yhdiste 90 - 93 -prosenttisella saannolla.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,61 (s, 1 H), 7,60 - 7,21
 30 (m, 1 H), 6,83 - 6,87 (m, 3 H), 6,85 (t, J=8,5 Hz, 1 H),
 3,80 (s, 6 H), 3,81 - 3,73 (m, 2 H), 3,53 - 3,49 (m, 1 H),
 3,38 - 3,33 (m, 1 H), 2,36 - 2,33 (m, 1 H), 2,25 - 2,20
 (m, 1 H), 1,51 (s, 3 H); IR puhdas gamma-max 3020, 2962,
 1697, 1605, 1512, 1246, 1030 cm⁻¹.

Esimerkki 30**5-O'-dimetoksitrityyli-3-O'-t-butyylidimetyyllisilyylitymidiini**

Dimetoksitrityylyitymidiini (5,0 g, 9,2 mmol) ja
 5 imidatsoli (1,2 g, 18,4 mmol) liuotettiin 15 ml:aan vedetöntä dimetyyliformamidia (DMF) ja lisättiin tert-butyylidimetyyllisilyylikloridiin (1,7 g, 11,5 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 4 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, laimennettiin etyyliasetaatilla ja pestiin vedellä, kylläisellä
 10 natriumkloridilla ja kuivattiin natriumsulfaatilla. Otsikon yhdisteestä saatiin kvantitatiivinen saanto.

Esimerkki 31**3'-O-t-butyylidimetyyllisilyylitymidiini**

5'-O-dimetoksitrityyli-3'-O-t-butyylidimetyyllisilyylitymidiini, joka oli valmistettu esimerkin 30 menetelmän mukaisesti (0,7 g, 1,1 mmol) käsiteltiin 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa 13 ml:lla trikloorietikkahapon 3-prosenttista liuosta metyleenikloridissa. Reaktioseos neutraloitiin sitten 5-prosenttisella (w/v) natriumbikarbonaattiliuoksella. Orgaaninen kerros kuivattiin natriumsulfaatilla. Otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatografias-
 20 sa, ajoliuoksena 0 - 30 -prosenttinen etyyliasetaattigradi-
 dientti metyleenikloridissa. Reakti-
 on saanto oli 85 %.

Esimerkki 32**3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-karbetoksimetyyleeni-5'-deoksitymidiini**

Kuivaan, hyvin sekoitettuun metyleenikloridiliuokseen (-78 °C) lisättiin oksalyylikloridia (33,0 mmol, 2,88 ml), jota seurasi DMSO:n tipoittainen lisäys
 30 (3,12 ml, 44 mmol). 10 minuutin kuluttua tymidiinialkoholi (5,6 g, 15,7 mmol), joka oli valmistettu esimerkin 31 menetelmän mukaisesti, lisättiin 20,0 ml:ssa CH₂Cl₂:ta ti-
 poittain 2 minuutin aikana ja sekoitusta jatkettiin vielä 45 minuuttia. Et₃N (8,1 ml, 58,1 mmol) lisättiin ja sekoitusta jatkettiin vielä 30 minuuttia. Reaktioseos tuotiin
 35

sitten -23 °C:een lämpötilaan 30 minuutin ajanjakson aikana. Sitten lisättiin karbetoksimetyleenitrifenyylifosforaani (10,94 g, 31,4 mmol) ja reaktioseosta sekoitettiin 12 tunnin ajan huoneenlämpötilassa. Reaktioseos laimennettiin sitten vedellä (2 x 125 ml) ja suolavedellä (50 ml) ja kuivattiin (Na_2SO_4). Epäpuhtas tuote puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena 20-prosenttinen etyyliasettaatti - heksaani → 40-prosenttinen etyyliasettaatti - heksaani, jolloin saatiin otsikon yhdisteen sekä cis-että trans-isomeerit suhteella 3:1. Yhdistetty saanto oli noin 72 - 76 %.

Tulokset trans-yhdisteelle. IR (puhtas) gamma-max 3205, 3180, 2982, 2964, 1698, 1490, 1274 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ 7,04 (s, 1 H), 6,87 (dd, $J=15,6$ ja 5,4 Hz, 1 H), 6,23 (t, $J=6,7$ Hz, 1 H), 6,03 (dd, $J=15,6$ ja 1,6 Hz, 1 H), 4,33 - 4,28 (m, 1 H), 4,14 (q, $J=71$ Hz, 2 H), 4,16 - 4,12 (m, 1 H), 2,28 - 2,19 (m, 1 H), 2,09 - 1,98 (m, 1 H), 1,87 (s, 3 H), 1,23 (t, $J=7,1$ Hz, 3 H), 0,81 (s, 9 H), 0,01 (s, 6 H);

Laskettu $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{N}_2\text{Si}$:lle; C, 56,58; H, 7,60; N, 6,60; Havaittu: C, 56,36; H, 7,30; N, 6,60.

Esimerkki 33

3'-O-t-butyylidimetyyllisilyyli-5'-karbetoksimetyyli-5'-deoksitymidiini

Tyydyttymättömän tymidiiniesterin (4,24 g, 10 mmol), joka oli valmistettu esimerkin 32 menetelmän mukaisesti, sekoitettuun liuokseen EtOAc:ssa lisättiin 200 mg 10-prosenttista Pd-C:tä typpi-ilmakehässä. Typpikaasu poistettiin alipaineella ja vety tuotiin. Tämä menettely toistettiin kahdesti ja sekoitusta jatkettiin yhden vety-ilmakehän paineessa 16 tunnin ajan. Sitten katalyysaattori suodatettiin Celite-kerroksen läpi ja liuotin poistettiin alipaineessa. Tuote kiteytettiin heksaanin ja etyyliasettaatin seoksesta. Otsikon yhdiste saatiin 95-prosenttisellä saannolla.

IR (puhdas) $\nu_{\max}$ 3180, 2925, 2950, 1696, 1486, 1260, 1240 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,20 (s, 1 H), 6,11 (t, 6,6=Hz, 1 H), 4,07 (q, $J=7,1$ Hz, 2 H), 4,03 - 3,98 (m, 1 H), 3,73 - 7,69 (m, 1 H), 2,51 - 2,32 (m, 2 H), 2,24 - 2,15 (m, 1 H), 1,18 (t, $J=7,1$ Hz, 3H), 0,81 (s, 9H), 0,01 (s, 6H).

Laskettu analyysi $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{N}_2\text{Si}$:lle:

C, 56,31; H, 8,03; N, 6,57

Havaittu: C, 55,91; H, 7,74; N, 6,50.

10 Esimerkki 34

3'-O-t-butyylidimetyylisilyyli-5'-deoksi-tymid-5-yyli-asetaldehydin valmistus

Tymidiiniesterin (3,41 g, 8 mmol), joka oli valmistettu esimerkin 33 mukaisesti, sekoitettuun liuokseen 60 ml:ssa kuivaa CH_2Cl_2 :ta (-78 °C) lisättiin DiBAL-H (16,4 ml, 1,0-molaarinen liuos heksaanissa, 16,4 mmol) tipoittain 3 minuutin ajan. 20 minuutin kuluttua reaktioseos laimennettiin 300 ml:lla EtOAc:tä ja pestiin kahdesti 50 ml:lla kylläistä natriumkaliumtratraattiliuosta. Orgaaninen faasi pestiin suolavedellä (25 ml) ja kuivatettiin (Na_2SO_4). Otsikon yhdiste puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena 50 % - 70 % etyyliasetaatti - heksaani, 85 - 87 -prosenttisella saannolla.

Esimerkki 35

25 Sellaisen deoksitymidiinidimeerin valmistus, jossa on nukleosidien välinen 3'-C-C-N-5' sidos (kuvio 3)

35a. Esimerkistä 27 peräisin olevan tymidiiniamiin (1,07 g, 3 mmol) ja esimerkistä 22 peräisin olevan tymidiinialdehydin (1,38 g, 3,6 mmol) sekoitettuun liuokseen, jossa oli 50 ml etanolia ja 10 ml puskurin vesiliuosta (pH = 5,5, NaH_2PO_4 -NaOH) lisättiin NaCNBH_3 -liuos THF:ssä (12 ml, 1,0-molaarinen liuos THF:ssä, 12 mmol) tipoittain 5 °C:een lämpötilassa 1 tunnin aikana. Reaktioseosta sekoitettiin vielä 4 tuntia ja laimennettiin 2,50 ml:lla etyyliasetaattia. Reaktioseos pestiin vedellä

(2 x 40 ml) ja suolavedellä (25 ml) ja kuivattiin (Na_2SO_4).
 Yhdiste 1 (kuvio 6) puhdistettiin flash-kromatografiassa
 eluoimalla ensin etyyliasetaatilla, jota seurasi 5 →
 8 -prosenttinen $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 62 - 64 -prosenttisella saan-
 nolla.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,60 (s, 1 H), 7,19 (s, 1
 H), 6,18 (t, $J = 6,6$ Hz, 1 H), 6,08 (t, $J=3,9$ Hz, 1 H),
 4,29 - 4,23 (m, 1 H), 4,15 - 3,98 (m, 1 H), 3,91 - 1,85
 (m, 1 H), 3,70 - 3,78 (m, 2 H), 2,95 - 2,87 (m, 1 H),
 2,84 - 2,66 (m, 3 H), 2,35 - 2,05 (m, 5 H), 1,94 (s, 3 H),
 1,93 (s, 3 H), 1,80 - 1,63 (m, 1 H), 1,55 - 1,45 (m, 1 H),
 0,93 (s, 9 H), 0,69 (s, 9 H), 0,11 (s, 6 H), 0,07 (s,
 6 H).

35b. Yhdiste 1 (kuvio 6) (166 mg, 0,23 mmol) lisät-
 tiin trifluorietikkahappoanhydridin (0,32 ml, 2,3 mmol) ja
 trietyyliamiinin (0,64 ml, 4,6 mmol) sekoitettuun liuok-
 seen CH_2Cl_2 :ssa (5,0 ml). 2 tunnin kuluttua reaktioseos
 sammutettiin NaHCO_3 :n vesiliuoksella (5,0 ml) ja laimennet-
 tiin EtOAc:llä (25 ml). Orgaaninen faasi pestiin vedellä
 (2 x 10 ml), suolavedellä (5 ml) ja kuivattiin (Na_2SO_4).
 Yhdiste 2 (kuvio 6) puhdistettiin flash-kromatografiassa,
 ajoliuoksena 7-prosenttinen MeOH CH_2Cl_2 :ssa, 91 - 93 -pro-
 senttisella saannolla.

35c. Yhdisteen 2 (164 mg, 0,2 mmol) sekoitettuun
 liuokseen THF:ssä (4,0 ml) lisättiin tetrabutyyliammonium-
 fluoridi (0,8 mmol) 0 °C:een lämpötilassa. 2 tunnin kulut-
 tua liuotin haihdutettiin ja yhdiste 3 (kuvio 6) puhdis-
 tettiin flash-kromatografialla, ajoliuoksena 5-prosent-
 tinen - 8-prosenttinen MeOH CH_2Cl_2 :ssa, 90-prosenttisella
 saannolla.

35d. Yhdisteen 3 (151 mg, 0,26 mmol) sekoitettuun
 liuokseen kuivassa pyridiinissä (3,0 ml) lisättiin 4,4-
 dimetyyliaminopyridiini (1,6 mg, 0,0128 mmol) ja trietyy-
 liamiini (0,057 ml, 0,42 mmol). 5 minuutin jälkeen lisät-
 tiin dimetoksitrityylikloridi (121 mg, 0,358 mmol) ja se-

koittamista jatkettiin. 2 tunnin kuluttua reaktioseos laimennettiin etyyliasetaatilla (25 ml) ja pestiin vedellä (2 x 10 ml), suolavedellä (5 ml) ja kuivattiin (Na_2SO_4). Epäpuhdas tuote puhdistettiin flash-kromatografialla, ajoliuoksena 7-prosenttinen MeOH CH_2Cl_2 :ssa, jolloin saatiin yhdiste 4 (kuvio 3) 85 - 87 -prosenttisella saannolla.

35e. Kuiva di-isopropyylietyyliamiini (0,15 ml, 0,67 mmol) lisättiin yhdisteeseen 4 (150 mg, 0,168 mmol), jota seurasi kuiva CH_2Cl_2 (0,5 ml). Sitten pulloa ravisteltiin alkoholin liuottamiseksi ja 2-syaanietyyli-N,N-di-isopropyylikloorifosforamidiitti (0,056 ml, 0,25 mmol) lisättiin 20 sekunnin aikana. 45 minuutin kuluttua reaktioseos sammutettiin CH_3OH :lla (1,0 ml), laimennettiin EtOAc :lla (50 ml) ja Et_3N :llä (1,0 ml), pestiin K_2CO_3 :n 10-prosenttisella vesiliuoksella (2 x 5,0 ml), jota seurasi suolavesi (5,0 ml) ja kuivattiin (Na_2SO_4). Epäpuhdas tuote puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena EtOAc , jolloin saatiin yhdiste 5 (kuvio 6) 70 - 75 -prosenttisella saannolla.

20 Esimerkki 36

Sellaisen deoksitymidiinidimeerin valmistus, jossa on nukleosidien välinen 3'-N-C-C-'5' sidos

(Kuvio 4)

36a. Esimerkin 29 amiinin (2,72 g, 5 mmol) ja esimerkin 34 aldehydin (2,29 g, 6 mmol) sekoitettuun liuokseen, jossa oli 50 ml etanolia ja 10 ml puskurin vesiliuosta ($\text{pH} = 5,5$, NaH_2PO_4 - NaOH), lisättiin tipoittain NaCNBH_3 -liuos THF :ssä (12 ml, 1,0-molaarinen liuos THF :ssä, 12 mmol) 5 °C:een lämpötilassa 1 tunnin aikana. Reaktioseosta sekoitettiin vielä 4 tuntia ja laimennettiin 2,50 ml:lla etyyliasetaattia. Reaktioseos pestiin vedellä (2 x 60 ml) ja suolavedellä ja kuivattiin (Na_2SO_4). Yhdiste 1 (kuvio 7) puhdistettiin flash-kromatografiassa eluoimalla ensin etyyliasetaatilla, jota seurasi 5-prosenttinen

MeOH-CH₂Cl₂. Yhdiste 1 (kuvio 7) saatiin 72 - 74 -prosent-tisella saannolla.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,56 (m, 1 H), 7,36 - 7,34 (m, 2 H), 7,29 - 7,15 (m, 8 H), 7,03 (s, 1 H), 6,77 (m, 3 H), 6,20 (t, J=6,0 Hz, 1 H), 6,08 (t, J=6,7 Hz, 1 H), 4,01 - 3,97 (m, 2H), 3,84-3,72 (m, 1 H), 3,72 (s, 6 H), 3,71 -3,63 (m, 1 H), 3,48 - 3,32 (m, 2 H), 3,30 - 3,22 (m, 1 H), 3,48 - 3,32 (m, 2 H), 3,30 - 3,22 (m, 1 H), 7,52 (m, 2 H), 2,27 - 2,14 (m, 3 H), 2,08 - 1,97 (m, 1 H), 1,83 (s, 3 H), 1,67 - 1,48 (m, 3 H), 1,43 (s, 3 H), 1,22 - 1,15 (m, 1 H), 0,82 (s, 9 H), 0,01 (s, 6 H).

36b. Yhdiste 1 (kuvio 7) (210 mg, 0,23 mmol) lisät-tiin trifluorietikkahappoanhydridin (0,32 ml, 2,3 mmol) ja trietyyliamiinin (0,64 ml, 4,6 mmol) sekoitettuun liuok- seen CH₂Cl₂:ssa (5,0 ml). 2 tunnin kuluttua reaktioseos sammutettiin NaHCO₃:n vesiliuoksella (5,0 ml) ja laimennet- tiin EtOAc:llä (25 ml). Orgaaninen faasi pestiin vedellä (2 x 10 ml), suolavedellä (5 ml) ja kuivattiin (Na₂SO₄). Yhdiste 2 (kuvio 7) puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena 7-prosenttinen MeOH CH₂Cl₂:ssa. Yhdiste 2 saa- tiin 89 - 91 -prosenttisella saannolla.

36c. Yhdisteen 2 (180 mg, 0,2 mmol) sekoitettuun liuokseen THF:ssä (4,0 ml) lisättiin tetrabutyyliammonium- fluoridi (0,4 ml, 1,0-molaarinen liuos THF:ssä, 0,4 mmol) 0 °C:een lämpötilassa. 2 tunnin kuluttua liuotin haihdu- tettiin ja tuote puhdistettiin flash-kromatografiassa li- sääntynyttä polaarisuutta käyttäen, ajoliuoksena 5-pro- senttinen → 8-prosenttinen MeOH CH₂Cl₂:ssa, jolloin saatiin yhdiste 3 (kuvio 7) 89-prosenttisella saannolla.

36d. Kuiva di-isopropyylietyyliamiini (0,15 ml, 0,67 mmol) lisättiin yhdisteeseen 3 (150 mg, 0,168 mmol), jota seurasi kuivan CH₂Cl₂:n lisäys (0,5 ml). Sitten pulloa ravisteltiin alkoholin liuottamiseksi ja 2-syaanietyyli- N,N-di-isopropyylikloorifosforamidiitti (0,056 ml, 0,25 mmol) lisättiin 20 sekunnin aikana. 45 minuutin kuluttua

reaktioseos sammutettiin CH_3OH :lla (0,1 ml), laimennettiin EtOAc :lla (50 ml) ja Et_3N :llä (1,0 ml), pestiin K_2CO_3 :n 10-prosenttisella vesiliuoksella (2 x 5,0 ml) ja suolavedellä (5,0 ml) ja kuivattiin (Na_2SO_4). Tuote puhdistettiin flash-kromatografiassa, ajoliuoksena EtOAc , jolloin saatiin yhdiste 4 70 - 75 -prosenttisella saannolla.

Esimerkki 37

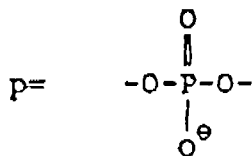
Sellaisten deoksitymidiinioligomeerien, jotka sisältävät nukleosidien välisen 3'-N-C-C-5'-sidoksen, synteesi

Tymidiinidimeeri-fosforamidiittiyhdisteitä, jotka oli tuotettu vaiheissa a - d yllä, käytettiin modifioidussa kiinteän faasin fosforamidiittisynteesimenetelmässä, jotta saataisiin aikaan taulukon 2 oligonukleosidisekvenssit.

Taulukko 2

Sekvenssi	Viitekoodi
5' TpTpTpTpTpTpTp[TnT]pT 3'	4
5' TpTpTpTpTp[TnT]pTpTpTpT 3'	5
5' [TnT]pTpTpTpTpTpTpTpTpT 3'	6

T=tymidiini



n= 3'-N-C-C-5'

Oligonukleotidisekvenssit syntetisoitiin 3'-päästä 5'-päähän.

Alkuvaihe oli 5'-dimetoksitrityyylideoksitymidiinin kiinnittäminen CPG-kantajaan 3'-sukkinaattisidoksella. Kiinnitetyn tymidiinin 5'-O-dimetoksitrityyyliryhmä saatettiin reagoimaan trikloorietikkahapon kanssa 5'-hydroksyy-

5

liryhmän suojauksen poistamiseksi.

Ketjun pidentäminen jatkui sitten standardinomaisilla toisiaan seuraavilla vaiheilla: suojauksen poisto, aktivointi, "cap"-rakenteen lisäys ja hapetus, sillä modifikaatiolla että aktivaatiovaiheen aikana ketjuun lisä-

10

ttiin haluttaessa -N-C-C-kytketty tymidiinidimeeri, joka oli valmistettu esimerkkien 30-37 menetelmien mukaisesti.

Ketjun kokoamisen lopussa tymidiinioligomeerit poistettiin CPG-kantajasta väkevällä ammoniumhydroksidilla. Liuosta käsiteltiin sitten edelleen 55 °C:een lämpötilassa 8 - 15 tunnin ajan emästen eksosyklisen amiinien

15

Esimerkki 38

Tetraetyleeniglykolipäätteisen anti-Ras-onkogeeni-DNA:n valmistaminen

20

38a. Dimetoksitrityyylitetraetyleeniglykolin (DMTTEG) valmistus

25

Tetraetyleeniglykolia (TEG) sekoitettiin ylimäärin (noin 100 ml) noin 7 ml:aan Hunigin emästä (5,1 g; 40 millimoolia) pyöreäpohjaisessa pullossa. Noin 3,08 g (10 millimoolia) dimetoksitrityylikloridia (DMTCl) lisättiin TEG-seokseen ja DMTCl-TEG-seos pidettiin jatkuvasti sekoittaen huoneenlämpötilassa (noin 25 °C) noin 8 - 12 tunnin ajan DMTTEG:n muodostamiseksi.

30

38b. Dimetoksitrityyylitetraetyleeniglykolisyaanifosfiinin (DMTTEGCP) valmistus

35

Kuusi grammaa DMTTEG:tä vaiheesta a) sekoitettiin 20 ml:aan kuivaa dikloorimetaania. Noin 6,2 ml Hunigin emästä lisättiin seokseen, mitä seurasi kloorifosfiiniseoksen tipoitainen additio, jolloin muodostui DMTTEGCP:tä. Kloorifosfiiniseos valmistettiin liuottamalla 1,67 g

2-syaanietyyli-N,N-di-isopropyylikloorifosforamidiittia 5 ml:aan kuivaa dikloorimetaania.

38c. TEG-päätteisen anti-RAS-onkogeeni-DNA:n valmistus

5 Taulukon 3 oligonukleotidit valmistettiin modifioidun kiinteään faasin fosforamidiittimenetelmän mukaisesti. GAIT, yllä. Oligodeoksinukleotidit syntetetoitiin 3' - 5' -suuntaan.

10 Taulukko 3

Sekvenssi	Viitekoodi
5' X GGA GCT GGT GGC GTA X (A) 3'	7
5' XX GGA GCT GGT GGC GTA XX (A) 3'	8
15 5' X CCT CGA CCA CCG CAT X (A) 3'	9
5' XX CCT CGA CCA CCG CAT XX (A) 3'	10
5' CCT CGA CCA CCG CAT 3'	11

X on TEG

20

A, C, G ja T edustavat deoksinukleotideja adenyyli, sytydyyli, guanidyli- ja vastaavasti tymidyylirahapot.

25

Joko nukleosidiadenosiini (7, 8, 9, 10) tai tymidiini (11) kiinnitettiin kiinteään CPG-kantajaan käyttämällä sukkinaattisidosta. GAIT, yllä. 11:n synteesi jatkui standardinomaisten kiinteään faasin fosforamidiittimenetelmien mukaisesti. Sekvensseissä 7, 8, 9 ja 10 synteesi eteni modifioidun fosforamidiittimenetelmän mukaisesti. Kiinnitetyn adenosiininukleosidin 5'-hydroksyyli-ryhmä saatettiin reagoimaan trikloorietikkahapon kanssa, jotta 5'-hydroksyyli-ryhmän suojaus saatiin poistettua. Tämän suojauksen poiston jälkeen kiinnitetty adenosiininukleosidi saatettiin reagoimaan aktivoivan agenssin, tetratsolin ja DMTTEGCP:tä sisältävän fosforamidiittireagenssin kanssa, joka oli valmistettu vaiheiden a ja b mukais-

35

ten menetelmien avulla yllä. Aktivaatiovaihetta seurasi reagoimattomien 5'-hydroksyyliiryhmien "cap"-rakenteen muodostaminen etikkahappoanhydridillä ja N-metyyli-imidatsolilla. Fosforisidos hapetettiin sitten jodilla standardinomaisilla menetelmillä.

Sekvensseissä 8 ja 10, jotka sisälsivät kaksi TEG-tähdettä, suojauksen poisto-, aktivointi-, "cap"-rakenteen lisäys- ja hapetusvaiheet toistettiin kuten yllä on kuvattu. Ketjun pidentäminen eteni perättäisillä suojauksen poisto-, aktivointi-, "cap"-rakenteen lisäys- ja hapetusvaiheilla, kuten yllä on kuvattu, sillä modifikaatiolla että haluttu nukleosidifosforamidiittireagenssi substituitiin DMTTEGCP:llä aktivointivaiheen aikana. Viimeisen halutun nukleosidin lisäämisen jälkeen joko yksi tai kaksi TEG-tähdettä kiinnitettiin 5'-päähän tavalla, joka oli analoginen TEG:n kiinnittämiseksi 3'-päähän.

Ketjun kokoamisen lopussa DNA-juoste poistettiin CPG-kantajasta konsentroidulla ammoniumhydroksidilla. Liuosta käsiteltiin sitten vielä 55 °C:een lämpötilassa 8 - 15 tuntia kaikkien suojausryhmien poistamiseksi emästen eksosyklisistä amiineista.

Esimerkki 39

Heksaetyleeniglykoli (HEG) -päätteisen anti-RAS-onkogeeni-DNA:n valmistaminen

Heksaetyleeniglykoli (HEG) -päätteinen anti-RAS-onkogeeni-DNA valmistettiin esimerkin 38 menetelmien mukaisesti. HEG saatettiin reagoimaan DMTCl:n kanssa, jolloin muodostui DMTHEG. DMTHEG saatettiin sitten reagoimaan syaanifosfiiniyhdisteen kanssa, jolloin muodostui DMTHEGCP, jota käytettiin esimerkin 38c) mukaisessa modifioidun kiinteän faasin fosforamidiittisynteesimenetelmässä, jolloin muodostui HEG-päätteistä anti-RAS-onkogeeni-DNA:ta. Näiden oligonukleotidien sekvenssit esitetään seuraavassa taulukossa 4.

Taulukko 4

Sekvenssi

5' X GGA GCT GGT GGC GTA X (A)3'
 5' XX GGA GCT GGT GGC GTA XX (A)3'
 5' X CCT CGA CCA CCG CAT X (A)3'
 5' XX CCT CGA CCA CCG CAT XX (A)3'
 5' CCT CGA CCA CCG CAT 3'

10 X on HEG

A, C, G ja T edustavat deoksinukleotideja adenyyli, syti-
 dyyli, guanidyyli- ja vastaavasti tymidyylihapot.

Esimerkki 40

15 TAG-päätteisen anti-RAS-onkogeneeni-DNA:n nukleaasi-
 resistenssi

Taulukon 4 oligonukleotidit liuotettiin veteen.
 DNA-konsentraatiot määritettiin sitten mittaamalla näyt-
 teiden absorbanssi 260 nm:n aallonpituudella (Perkin Elmer
 20 Lambda 4C spektrofotometrillä huoneenlämmössä) ja käyt-
 tämällä laskettuja ekstinktiokertoimia [Cantorin ja War-
 sawin menetelmä, CRC Handbook of Biochemistry and Molecu-
 lar Biology, 3. painos, vol. 1, CRC Press, sivu 589
 (1985)].

25 Oligonukleotideja inkuboitiin 2 tuntia 37 °C:een
 lämpötilassa kokonaisjuostekonsentraationa 6 - 7 µM solu-
 viljelyelatusaineessa, joka sisälsi RPMI 1640:ää, joka oli
 20-millimolaarinen N-(2-hydroksietyyli)-piperatsiini-N'-
 (2-etaanisulfonihapon) suhteen, pH 7,4, ja 10-prosenttinen
 30 vasikan sikiön seerumin (FCS) suhteen (GIBCO Laboratories,
 Grand Island, NY). FCS inaktivoitiin lämmöllä 56 °C:een
 lämpötilassa 0,5 tunnin ajan ennen käyttöä. Näytteet si-
 joitettiin sitten jäille ja proteiinit poistettiin käyt-
 tämällä viittä uuttua 24:1 kloroformi:isoamyylialkoholis-
 35 sa. Näytteet varastoitiin joko pakastettuna -20 °C:een

lämpötilassa tai ladattiin heti jäähdytettyyn (4 °C) WISP (Waters) HPLC-autoinjektoriin.

Oligonukleotidien hydrolysoituminen kvantitoitiin määrittämällä lähtöyhdisteen katoamisen määrä. Oligonukleotidit (reaktioseoksesta) erotettiin LKB Ultrachrome GTi -kaksipumppuisella kromatografiajärjestelmällä, joka oli varustettu kiinteän aallonpituuden detektorilla (260 nm) ja piirtävällä integraattorilla, käyttämällä (Watersin) GenPak-anioninvaihtopylvästä, joka oli tasapainotettu puskurissa A (1 mM EDTA; 15 mM natriumfosfaatti, pH 8,5). Pylvään lämpötila pidettiin 60 °C:ssa käyttämällä Watersin pylväsuunia. Käytettiin viidenkymmenen mikrolitran näytteen injektio-tilavuuksia. Oligonukleotidit eluotettiin käyttämällä lineaarista gradienttia 0 - 100 % puskuria B (puskuri A, joka oli 0,5-molaarinen NaCl:n suhteen) 60 minuutin ajan. Puskurin virtausnopeus oli 1 ml/min.

Sen jälkeen kun oli inkuboitu (2 h) vasikan sikiön seerumin yhteydessä olevan eksonukleaasin läsnäollessa, yhdisteiden 7 tai 10 hajoamista ei havaittu (taulukko 5, katso pääpiikin hajoamisen prosenttiosuus). Samanlaisen inkubaatiovaiheen aikana 87,0 % ja 82,1 % 9:stä ja vastaavasti 8:sta säilyi. Vertailun vuoksi vain 24,7 % oligomeeristä 11 säilyi saman inkubaatioajan jälkeen.

Taulukko 5

Näytteen tunnus	Alue-pääpiikki/ 0.0 min	Alue-pääpiikki 2.0 t	Hajoamis-% pääpiikki
7	0.2325	0.3663	0,0
9	0.3744	0.3258	13,0
8	0.2164	0.1777	17,9
10	0.3642	0.3697	0,0
11	1.2861	0.3177	75,3

Kaikki neljä TEG-oligomeeriä kykenivät vastustamaan FCS:ään liittyvien eksonukleaasien aikaansaamaa hydrolysoitumista. bis-diTEG-oligomeerit (7 ja 10) vaikuttivat olevan täysin hydrolyysiresistenttejä. TEG-derivatisoidut oligodeoksinukleotidit edustavat merkittäviä parannuksia modifioimattomiin yhdisteisiin verraten eksonukleaasiresistenssin kannalta.

Esimerkki 41

TEG-antisense-oligomeerien kyky estää proteiini-ekspressiota ja ihmisen kasvainsolulinjojen kasvua ja perifeerisen veren lymfosyyttien PHA-stimulaatiota

Muut (Heikkilä, R. ym., Nature, 328:445-449, 1987) ovat osoittaneet, että modifioimattomat antisense-oligonukleotidit, jotka on suunnattu c-myc-onkogeenin initiaatiokodonialuetta kohtaan, kykenivät estämään c-myc-proteiinin ekspressiota PHA-stimuloiduissa perifeerisen veren lymfosyyteissä (PBL), mikä johti siihen että solut estyivät etenemästä solusyklin S-vaiheeseen. C-myc-suunnatun antisense-DNA:n osoitettiin myös estävän ihmisen HL-60-erytroleukemiasolujen kasvua in vitro (Wickstrom, E.L. ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:1028-1032, 1988). Taulukossa 6 esitetyt sekvenssit valmistettiin ja arvioitiin esimerkkien 41a ja 41b mukaisilla menetelmillä.

Taulukko 6

5' AAC GTT GAG GGG CAT 3'

5' XX AAC GTT GAG GGG CAT XX A 3'

(X = TEG)

41a. Vertaillaan miten (TEG:llä) modifioitu ja ei-modifioitu c-myc-antisense-DNA vaikuttaa PHA-stimuloitujen PBL:ien etenemiseen solusyklin S-vaiheeseen.

Ihmisen PBL:iä stimuloitiin PHA:lla 48 tuntia taulukon 6 "antisense"-oligonukleotidisekvenssien läsnä- tai poissaollessa. Solusyklin S-vaiheessa olevan solupopulaation prosenttiosuus kussakin käsittelyryhmässä käsittelemättömään kontrolliin verrattuna määritettiin standardinomaisilla virtaussytometrisillä tekniikoilla. Tulokset esitetään taulukossa 7.

Taulukko 7

10	Oligonukleotidi	Konsentraatio (μ M)	% kontrollista S-faasi
15	Ei	100	
	5' AAC GTT GAG GGG CAT 3'	30 60	75 $\pm$ 6 9 $\pm$ 10
20	5' XX AAC GTT GAG GGG CAT XX A 3'	30 60	80 $\pm$ 4 < 6

Tulokset osoittavat, että TEG:n läsnäolo sekä 3'-että 5'-päässä ei muuta "antisense"-DNA:n inhiboivaa vaikutusta.

41b. Vertaillaan miten (TEG:llä) modifioitu ja modifioimaton C-MYC-antisense-DNA vaikuttaa C-MYC-proteiinin ekspressioon MOLT-4 T-solu-leukemiasoluihin.

Asynkronisia, eksponentiaalisesti kasvavia Molt-4-soluja inkuboitiin 8 tuntia c-myc:iin suunnatun antisense-DNA:n läsnäollessa (60 μ M) tai poissaollessa. Soluja inkuboitiin sitten 45 minuuttia 35 S-metioniinin läsnäollessa ja c-myc-proteiinipitoisuus kvantitoitiin käyttämällä radioimmunopresipitaatiota c-myc-vasta-aineella. Tulokset esitetään taulukossa 8.

Taulukko 8

	Oligonukleotidi	Konsen- traatio (μ M)	c-myc- proteiinin vähentymis- prosentti
5			
10	Ei		0
	5' AAC GTT GAG GGG CAT 3'	60	61,0 $\pm$ 2,6
	5' XX AAC GTT GAG GGG CAT XX A 3'	60	67,9 $\pm$ 0,7

15

TEG:iä sisältävä antisense-DNA oli hieman tehokkaampi kuin modifioimaton antisense-DNA.

20 4lc. Vertaillaan miten (TEG:llä) modifioitu ja modifioimaton c-myc-antisense-DNA vaikuttaa ihmisen CCRF-CEM-T-solu-leukemiasolujen kasvuun in vitro.

25 Asynkronisia, eksponentiaalisesti kasvavia CCRF-CEM-soluja inkuboitiin 48 tuntia antisense-DNA:n läsnä tai poissaollessa ja sitten solulukumäärät määritettiin kussakin käsittelyryhmässä. Sitten määritettiin se antisense-DNA:n konsentraatio, joka vaadittiin solujen kasvun inhiboimiseksi 50:llä prosentilla (IC_{50}). Sekä modifioidulla että modifioimattomalla taulukon 5 antisense-DNA:illa vaikutti olevan noin yhtäsuuret 40 μ M:n (IC_{50})-konsentraatiot.

30

Nämä tulokset osoittavat, että TEG:n läsnäolo antisense-DNA:n 3'- ja 5'-päässä ei vaikuta sellaisen antisense-DNA:n kykyyn hybridisoitua kohdenukleiinihappojen kanssa ja inhiboida niiden toimintaa.

Esimerkki 42

Muita eksonukleaasistabiileja oligonukleotideja

Eksonukleaasistabiilit oligonukleotidit, jotka esitetään taulukossa 9, valmistettiin esimerkin 38 menetelmien mukaisesti.

Taulukko 9

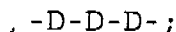
	5'	XX A-ACG-TTG-AGG-GGC-ATX-XA	3'
10		XX GCC-CGC-CTC-GGT-CCC-CGC-CCX-XA	
		XX GGG GCG GAG TTA GGG GCG GCG GGX XA	
		XX GGG-GAG-GAG-GGA-GGG-GAG-GGA-XXA	
		XX GCG-GAG-GTG-GGT-GGG-GAG-GGT-XXA	
		AAG GTT GAG GGG CAT XXA	
		X AA-CGT-TGA-GGG-GCA-TTX-A	
		XX TTC-GCT-TAC-CAG-AGT-XXA	
		XX GCG-GGA-GGC-TGC-TGG-XXA	
15		XX GGA-GGC-TGC-TGG-AGC-XXA	
		XX CAA-GTT-CAT-AGG-TGA-TTG-CTC-XXA	
		AL-CAC-TCC-TTT-AGC-AAG-XXA	
		AL-GAA-CGA-TTT-CCT-CAC-XXA	
		XX CTC-ACT-GCC-GCG-CAT-XXA	
		XX GGG-TCT-TCG-GGC-CAT-XXA	
		XX GTC-GAC-CGG-TTC-CAT-XXA	
		XX TGT-AAC-TGC-TAT-AAA-XXA	
20		XX GTT-CCT-CCT-CTT-TAA-XXA	
		XX TAC-TGC-CTT-ATA-TTC-XXA	
		XX TAC-TGA-CTT-ATA-TTT-XXA	
		XX TTT-ATA-TTC-AGT-CAT-XXA	
		XX TGG-GGA-GGG-TGG-GGA-GGG-TGG-GGA-AGG-XXA	
		XX CTT-ATA-TTC-CGT-CAT-XXA	
		XX TAA-CGC-CTA-TTC-TGC-XXA	
		XX CGT-CTT-ATC-CGC-AAT-XXA	
25		XX TTG-CTC-TCC-TCT-GTC-XXA	
		XX CTG-TCT-CCT-CTC-GTT-XXA	
		XX ATC-TAC-TGG-CTC-CAT-XXA	
		XX TAC-CTC-GGT-CAT-CTA-XXA	
		XX ACA-CCC-AAT-TCT-GAA-ATG-GXX-A	
		XX GGT-AAA-GTC-TTA-ACC-CAC-AXX-A	
		XX TAC-GGG-GAG-TTG-CAA-XXA	

X on TEG

Kuten ammattimiehille on ilmeistä, voidaan tehdä monia variaatioita ja modifikaatioita poikkeamatta tämän keksinnön hengestä ja suojapiiristä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen yhdisteen valmistamiseksi, joka sisältää oligonukleosidisekvenssin, joka sisältää 6 - 200 emästä, ja jossa on kolmiatominen nukleosidien välinen sidos, jolla on kaava:



jossa kukin D on toisistaan riippumatta CHR tai NR⁶, jossa R on toisistaan riippumatta vety, OH, SH tai NH₂, ja jossa R⁶ on vety tai C₁₋₂-alkyyli, sillä edellytyksellä että vain yksi D on NR⁶, t u n n e t t u siitä, että

(A) oligonukleosidit, joita yhdistää kolmiatominen nukleosidien välinen sidos, syntetisoidaan niin, että nukleosidit, joissa on aldehydi- ja ylidi-funktionaalisuuksia 3'- ja vastaavasti 6'-kohdissa, saatetaan reagoimaan Wittigin olosuhteissa;

(B1) oligonukleosidisekvenssit, joita yhdistää kahden hiiliatomin ja yhden typpiatomin muodostama nukleosidien välinen sidos muotoa C-C-N, syntetisoidaan niin, että aldehydejä sisältävät nukleosidit saatetaan reagoimaan nukleosidien kanssa, jotka sisältävät amiinifunktionaalisuuksia, pelkistävässä oloissa; tai

(B2) oligonukleosidit, joita yhdistää nukleosidien välinen kahden hiili- ja yhden typpiatomin muodostama liitos muotoa N-C-C, syntetisoidaan niin, että nukleosidit, joissa on aldehydi- ja amiinifunktionaalisuuksia 3'- ja vastaavasti 5'-kohdissa, saatetaan reagoimaan pelkistävässä olosuhteissa;

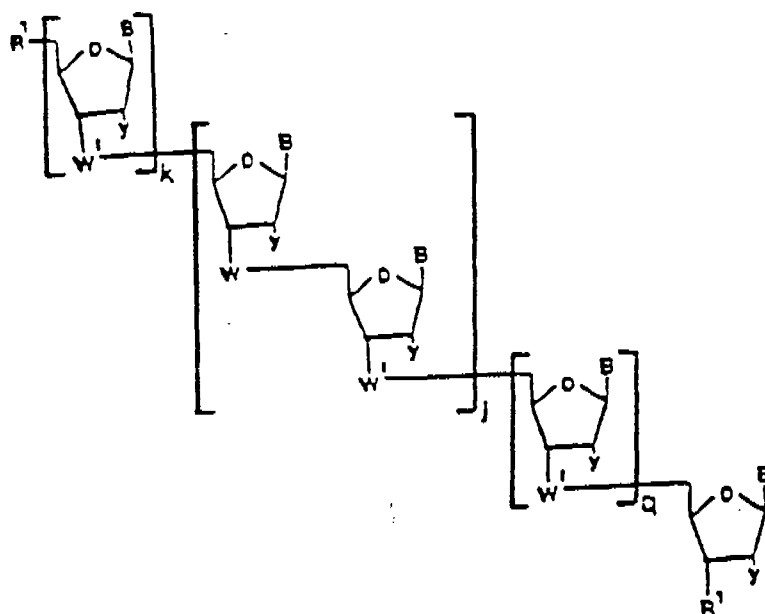
ja nukleosididimeerit tai korkeammat oligomeerit konjugoidaan, jolloin muodostuu oligonukleotideja, joilla on mikä tahansa haluttu pituus.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yhdiste, jossa

on alkyleeni-dioli jommassa kummassa päässä tai molemmissa päissä.

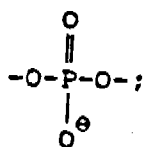
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että alkyleeni-dioli on tetraetyleeniglykoli tai heksaetyleeniglykoli.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistetaan yhdiste, joka sisältää oligonukleosidisekvenssin, jolla on kaava:



jossa W on -D-D-D-, jossa kukin D on toisistaan riippumatta CHR tai NR⁶, jossa R on toisistaan riippumatta vety, OH, SH tai NH₂, ja jossa R⁶ on vety tai C₁₋₂-alkyyli, sillä edellytyksellä että vain yksi D on NR⁶,

kukin W' on toisistaan riippumatta W tai



kukin R¹ on toisistaan riippumatta OH, SH, NR²R³, jossa R² ja R³ ovat toisistaan riippumatta vety tai C₁₋₆-alkyyli tai NHR⁴, jossa R⁴ on C₁₋₁₂-alkyyli;

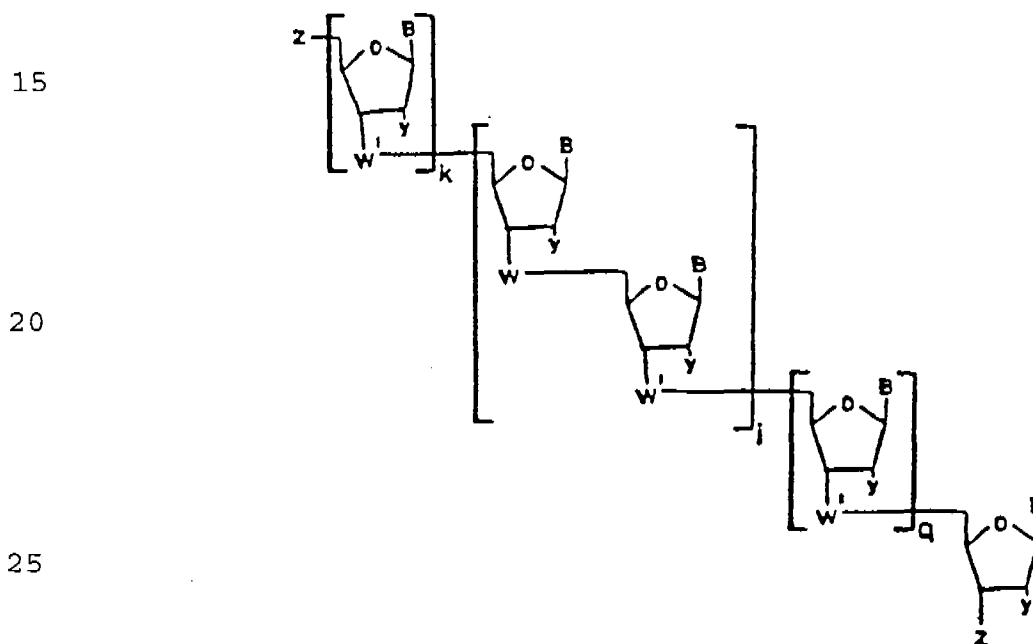
kukin y on toisistaan riippumatta H tai OH;
 kukin B on toisistaan riippumatta adeniini, syto-
 siini, guaniini, tymiini, urasiili tai niiden modifika-
 tiot;

5 j on kokonaisluku 1 - 200;

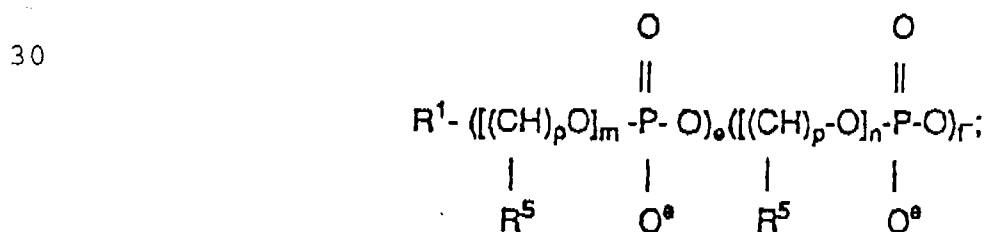
k on 0 tai kokonaisluku 1 - 197; ja

q on 0 tai kokonaisluku 1 - 197, sillä edelly-
 tyksellä että summa j + k + q on 4 - 200.

10 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
 t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yhdiste, joka
 sisältää oligonukleosidisekvenssin, jossa on 6 - 200
 emästä, ja jolla on kaava:



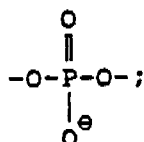
jossa kukin Z on toisistaan riippumatta R¹ tai



35 jossa W on -D-D-D-, jossa kukin D on toisistaan

riippumatta CHR tai NR^6 , jossa R on toisistaan riippumatta vety, OH, SH tai NH_2 , ja R^6 on vety tai C_{1-2} -alkyyli, sillä edellytyksellä että vain yksi D on NR^6 , kukin W' on toisistaan riippumatta W tai

5



kukin R^1 on toisistaan riippumatta OH, SH, NR^2R^3 ,
10 jossa R^2 ja R^3 ovat toisistaan riippumatta vety tai C_{1-6} -alkyyli tai NHR^4 , jossa R^4 on C_{1-12} -asyyli;

kukin R^5 on toisistaan riippumatta vety tai C_{1-12} -alkyyli;

kukin y on toisistaan riippumatta H tai OH;

15

kukin B on toisistaan riippumatta adeniini, syto-
siini, guaniini, tymini, urasiili tai niiden
modifikaatio; kukin e ja f on toisistaan riippumatta
kokonaisluku 0 - 50, sillä edellytyksellä että ainakin e
ja f on ainakin 1;

20

j on kokonaisluku 1 - 200;

k on 0 tai kokonaisluku 1 - 197; ja

kukin m ja n on toisistaan riippumatta kokonaisluku
1 - 200;

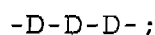
kukin p on toisistaan riippumatta 2 - 4; ja

25

q on 0 tai kokonaisluku 1 - 197, sillä edelly-
tyksellä että summa $j + k + q$ on 4 - 200.

30

6. Menetelmä, jolla voidaan estää nukleaasin ai-
kaansaama yhdisteiden hajoaminen, t u n n e t t u siitä,
että: valmistetaan oligonukleosidisekvenssejä, joissa on 6
- 200 emästä, ja joilla on kolmiatominen nukleosidien
välinen sidos, jolla on kaava:

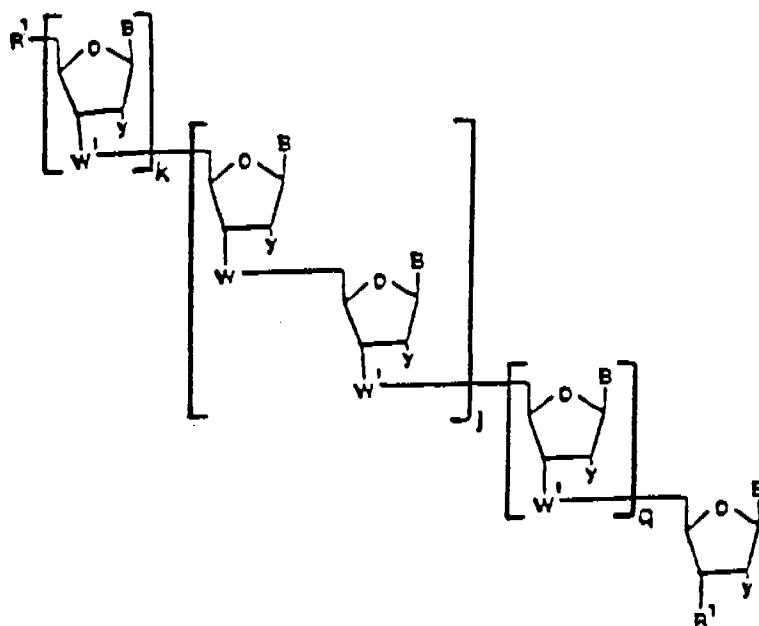


35

jossa kukin D on toisistaan riippumatta CHR tai NR^6 ,

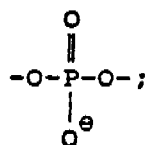
jossa R on toisistaan riippumatta vety, OH, SH tai NH_2 , ja R^6 on vety tai C_{1-2} -alkyyli, sillä edellytyksellä että vain yksi D on NR^6 .

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä,
tunnettu siitä, että oligonukleosidisekvensseillä
on kaava:



jossa W on -D-D-D-, jossa kukin D on toisistaan riippumatta CHR tai NR^6 , jossa R on toisistaan riippumatta vety, OH, SH tai NH_2 , ja R^6 on vety tai C_{1-2} -alkyyli, sillä edellytyksellä että vain yksi D on NR^6 ;

kukin W' on toisistaan riippumatta W tai



kukin R^1 on toisistaan riippumatta OH, SH, NR^2R^3 , jossa R^2 ja R^3 ovat toisistaan riippumatta vety tai C_{1-6} -alkyyli tai NHR^4 , jossa R^4 on C_{1-12} -alkyyli;

kukin y on toisistaan riippumatta H tai OH;

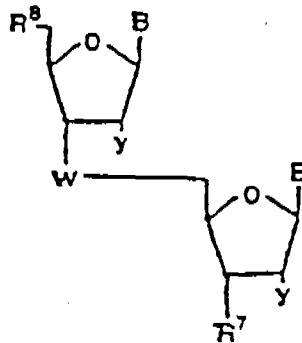
kukin B on toisistaan riippumatta adeniini, sytosiini, guaniini, tymiini, urasiili tai niiden modifikaatiot;

j on kokonaisluku 1 - 200;

k on 0 tai kokonaisluku 1 - 197; ja

q on 0 tai kokonaisluku 1 - 197, sillä edellytyksellä että summa $j + k + q$ on 4 - 200.

8. Yhdiste, joka sisältää nukleosididimeerin, jolla on kaava:



jossa W on -D-D-D-, jossa kukin D on toisistaan riippumatta CHR tai NR^6 , jossa R on toisistaan riippumatta vety, OH, SH tai NH_2 , ja R^6 on vety tai C_{1-2} -alkyyli, sillä edellytyksellä että vain yksi D on NR^6 ;

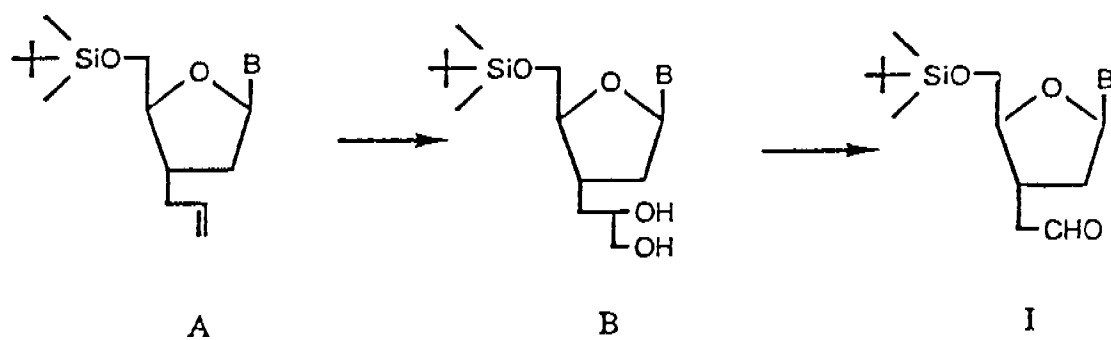
kukin B on toisistaan riippumatta adeniini, sytosiini, guaniini, tymiini, urasiili tai niiden modifikaatiot;

R^7 on OH, t-butyylidimetyylisilyylioksi tai fosforamidiitti;

R^8 on OH, suojausryhmä tai t-butyylidimetyylisilyylioksi; ja

kukin y on toisistaan riippumatta H tai OH.

1a



1b

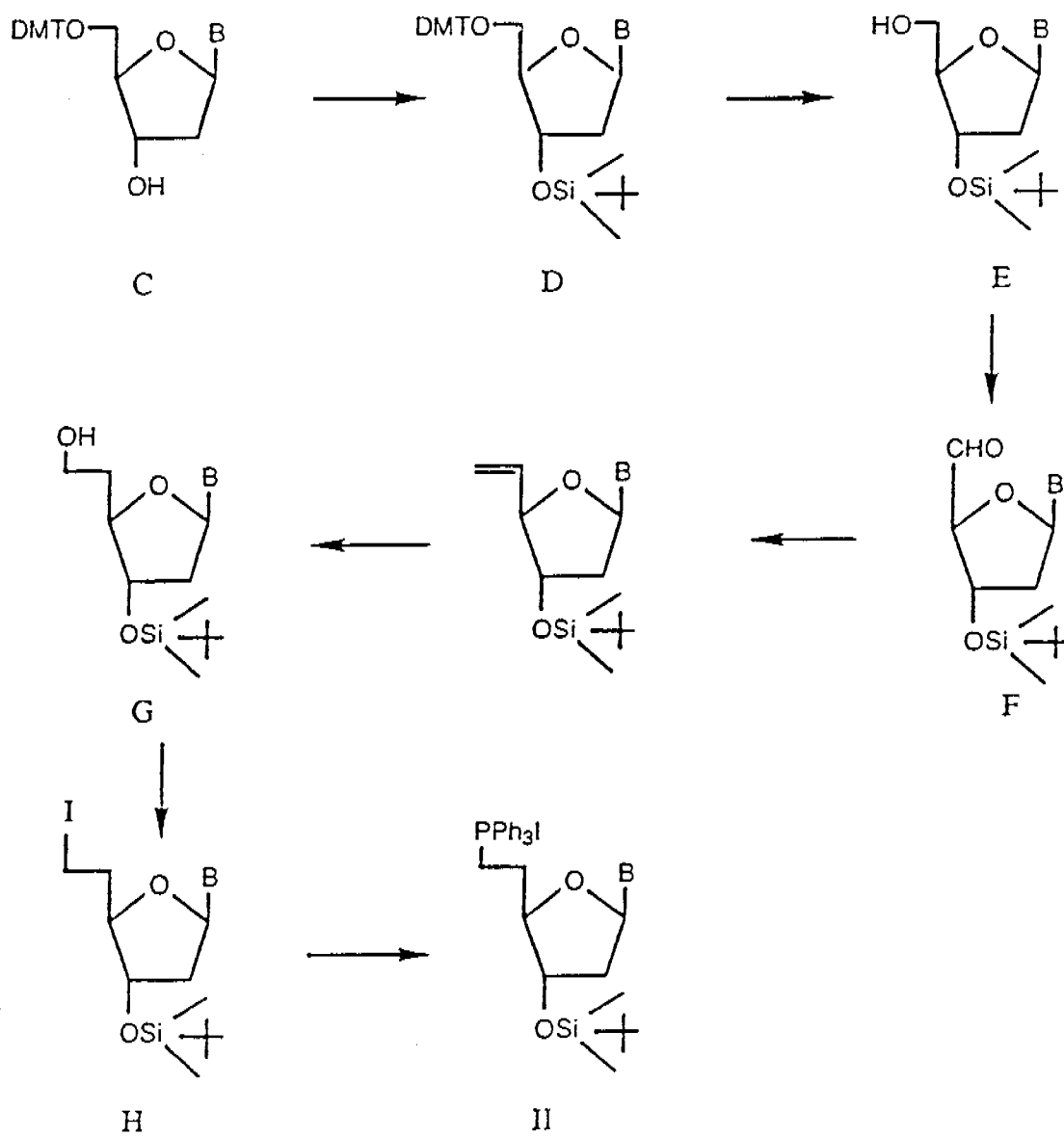


FIG. 1

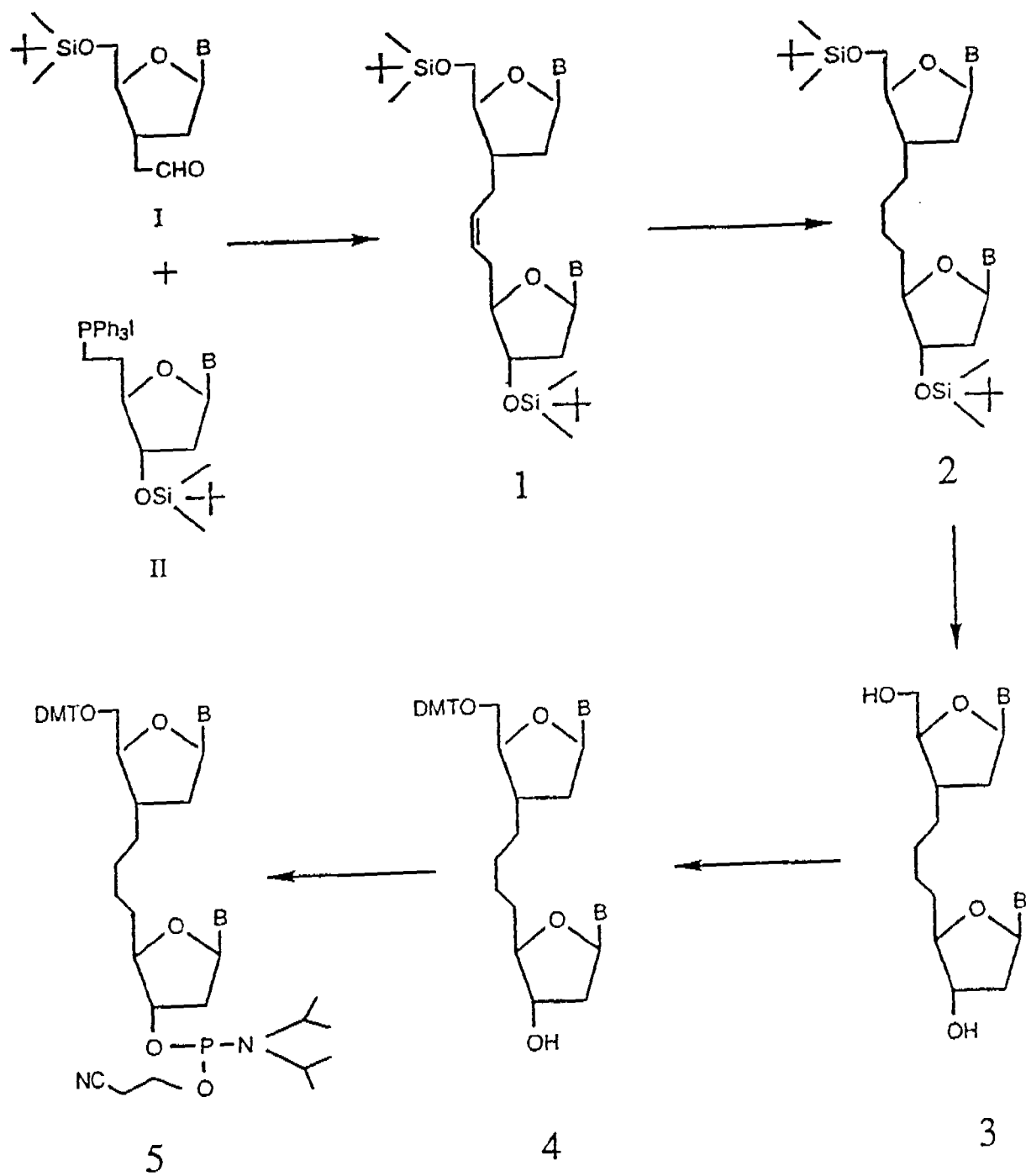


FIG. 2

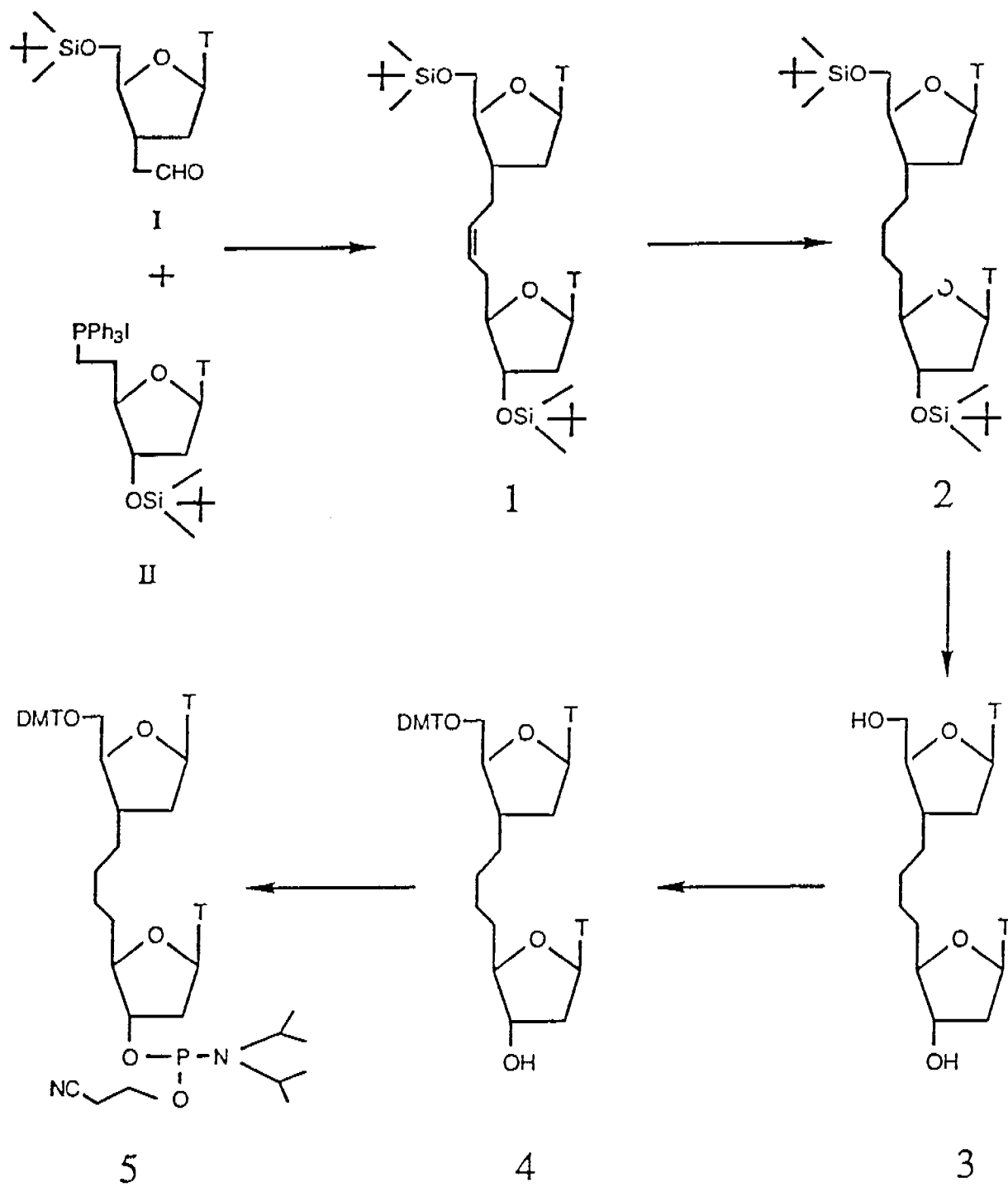


FIG. 3

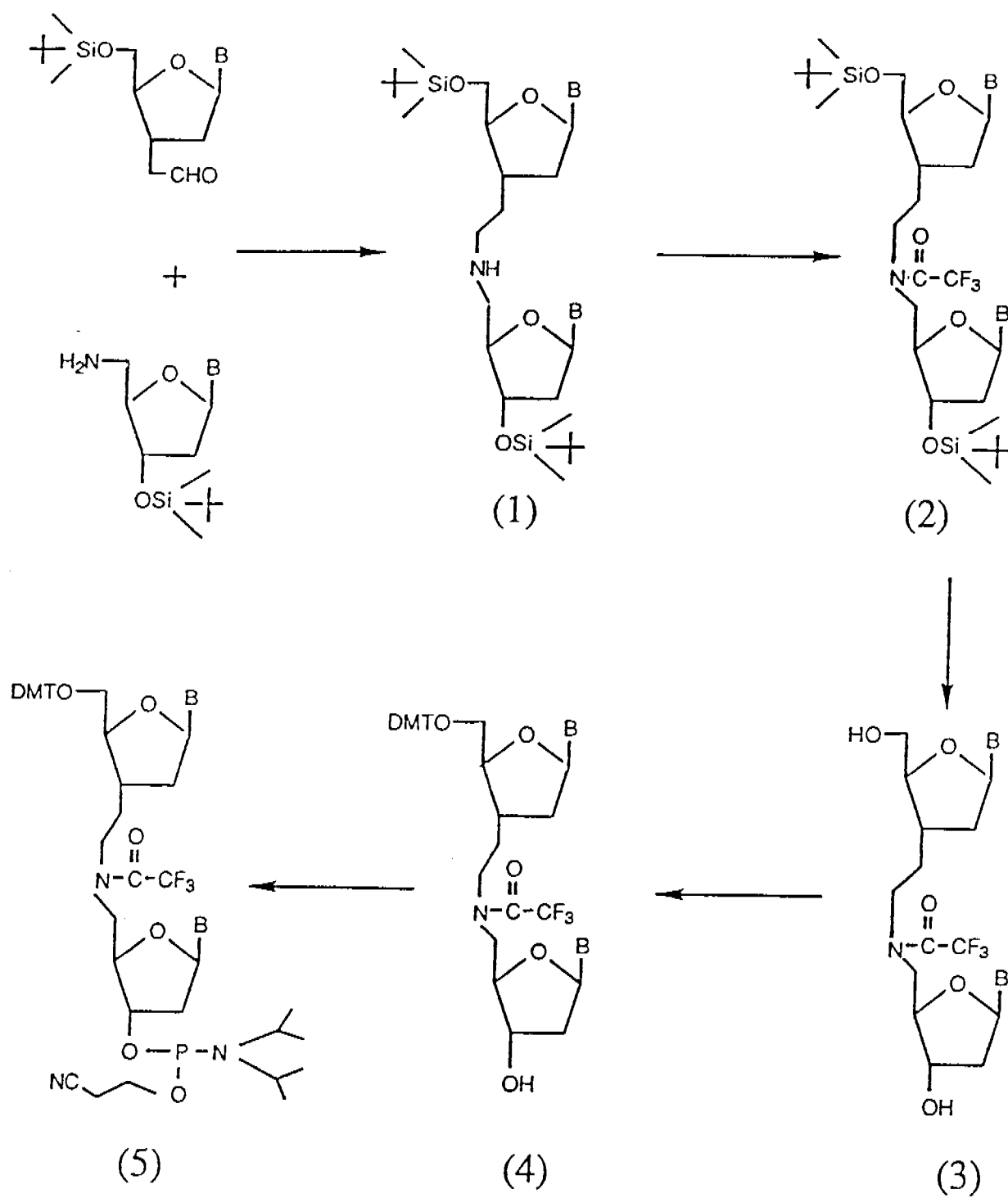


FIG. 4

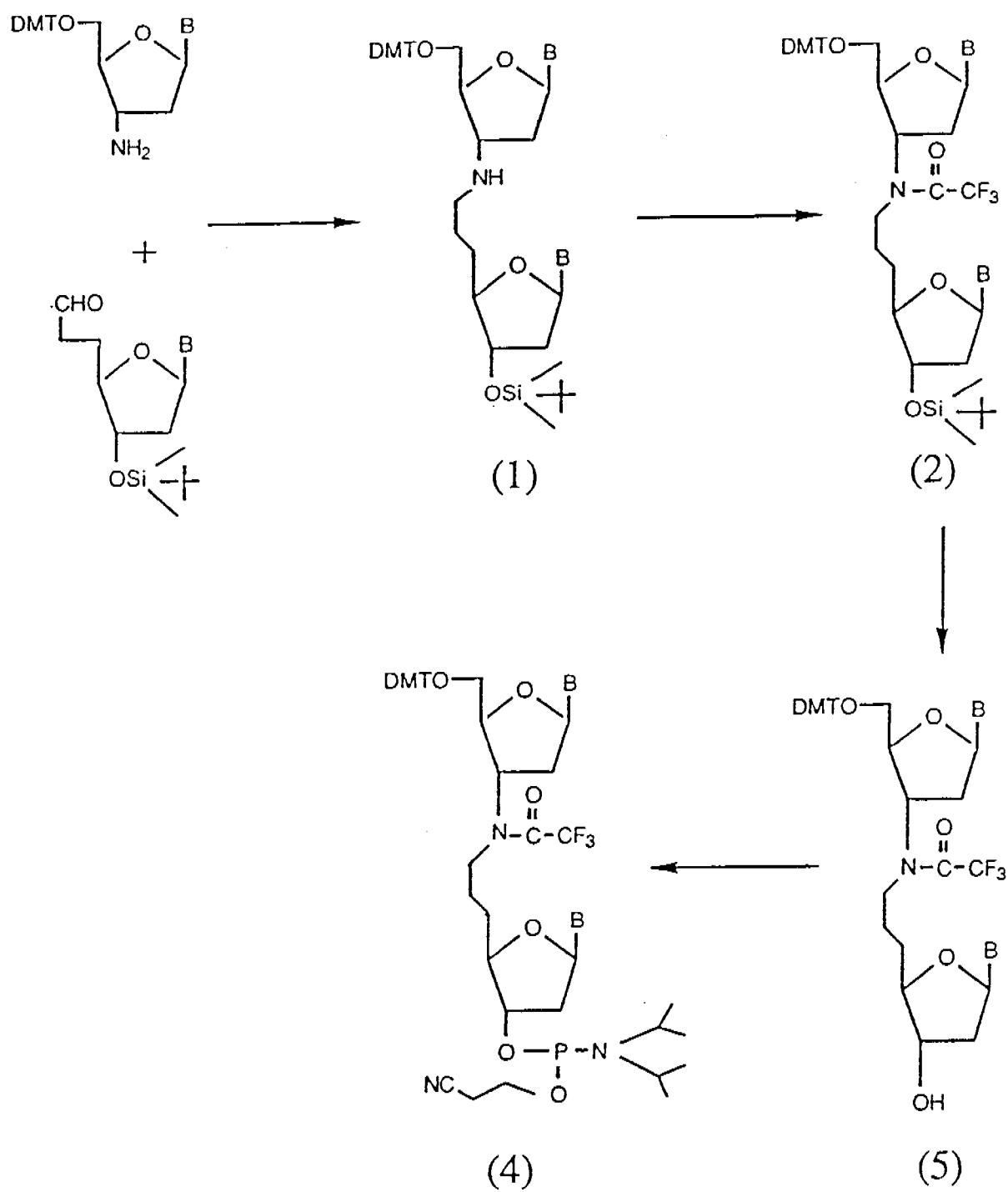


FIG. 5

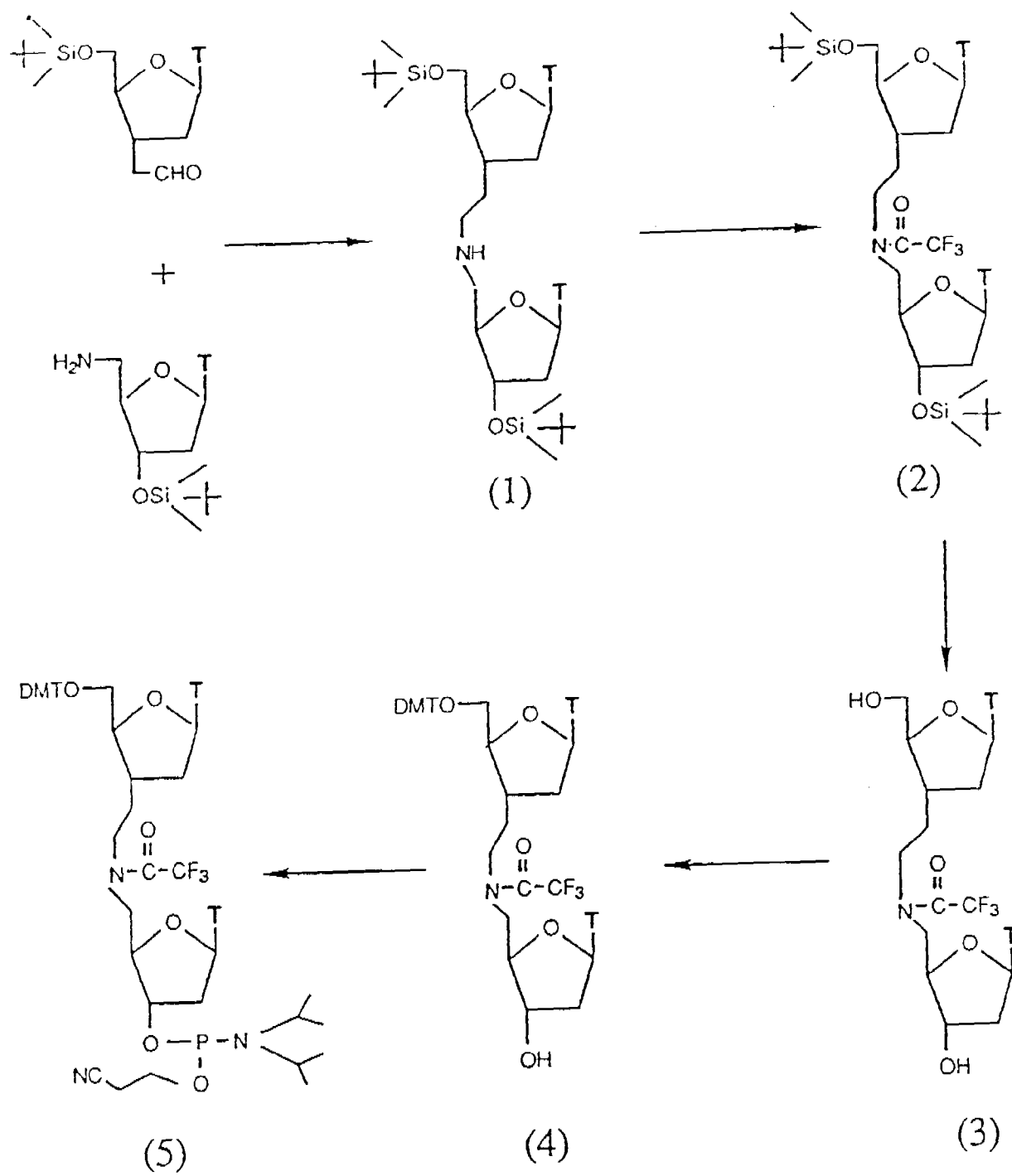


FIG. 6

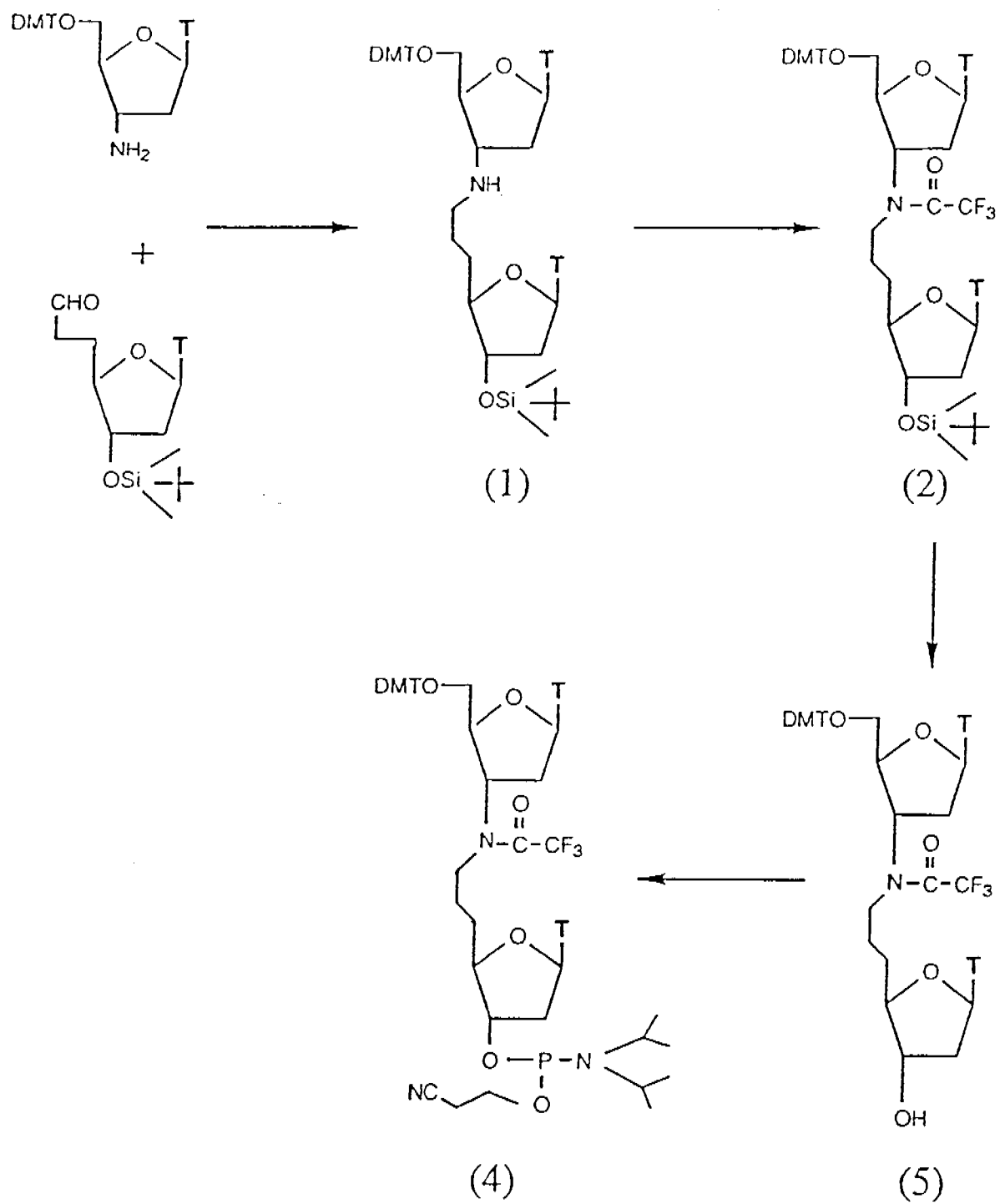
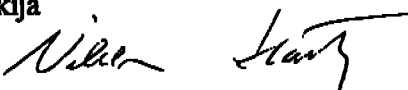


FIG. 7

HAKEMUSNUMERO	LUOKITUS
930455	
	☐ jatkuu kääntöpuolella

TUTKITTU AINEISTO
Patenttivirastojen julkaisut FI, GB, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US
C07H 21/00 - 21/04 , 19/04 , 19/06 , 19/16
☐ jatkuu kääntöpuolella
Muu aineisto
PCT (EPO) viitejulkaisut
☐ jatkuu kääntöpuolella

VIITEJULKAISUT		
Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
	1. Tetrahedron Letters, vol.31 (1990) no.17, Matteucci, M., Deoxyoligonucleotide analogs based on formacetal linkages, 2385-88;	
	2. Chemical Abstracts, vol.113 (1990), 172586p: Tetrahedron Lett. 1990, 31(3), 335-8.	
		☐ jatkuu kääntöpuolella
*) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este		
Päiväys	Tutkija	
27.11.1997		

TUTKITTU AINEISTO (jatkoa etusivulta)[illegible]

MUU AINEISTO (jatkoa etusivulta)

1912157

VIITEJULKAISUT (jatkoa etusivulta)This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue or grey ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There is no handwriting or other markings on the paper.