

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

293 731

(13) Druh dokumentu:

B6

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1997-1291**
 (22) Přihlášeno: **02.11.1995**
 (30) Právo přednosti: **02.11.1994 US 1994/333545**
 (40) Zveřejněno: **15.10.1997**
 (**Věstník č. 10/1997**)
 (47) Uděleno: **14.05.04**
 (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **14.07.2004**
 (**Věstník č. 7/2004**)
 (86) PCT číslo: **PCT/US1995/014600**
 (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1996/014329**

(51) Int. Cl. : ⁷

C 07 H 19/06
C 07 H 19/10
C 07 H 19/16
C 07 H 19/20
C 07 H 19/24
A 61 K 31/7052
A 61 K 31/7088

(73) Majitel patentu:

ICN PHARMACEUTICALS, Costa Mesa, CA, US

(72) Původce:

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

(74) Zástupce:

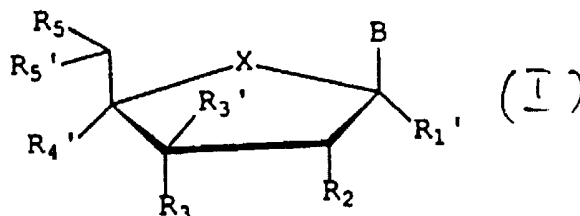
Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

Nukleosid a oligonukleotid tento nukleosid obsahující

(57) Anotace:

Nukleosidy s modifikovanou cukernou částí obecného vzorce I, přičemž tento nukleosid lze převést na fosforamidit, který lze použít k syntéze oligonukleotidu, obsahujícího uvedený nukleosid a použitelného při antisensních terapiích, při kterých oligonukleotid s modifikovanou cukernou částí zvyšuje rezistenci vůči nukleasám a absorpci buňkami, přičemž zůstává zachována specifita sekvencí a afinita k cílovým nukleovým kyselinám in vitro nebo in vivo.



CZ 293731 B6

Nukleosid a oligonukleotid tento nukleosid obsahující

Oblast techniky

5

Vynález se týká nukleosidu s modifikovanou cukernou částí, přičemž tento nukleosid lze převést na fosforamidit, který lze použít k syntéze oligonukleotidu, obsahujícího uvedený nukleosid a použitelného při antisensních terapiích, při kterých oligonukleotid s modifikovanou cukernou částí zvyšuje rezistenci vůči nukleasám a absorpci buňkami, přičemž zůstává zachována specifita sekvencí a afinita k cílovým nukleovým kyselinám *in vitro* nebo *in vivo*.

10

Dosavadní stav techniky

15 Terapeutické použití oligonukleotidů má velký význam a je popsáno například v (1) P. C. Zamecnik a M. L. Stephenson, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1978, 75, 280, 285, (2) E. Uhlmann a A. Peyman, Chemical Reviews, 1990, 90, 543 až 584, (3) J. Goodchild, Bioconjugate Chemistry, 1990, 1, 165 až 187 a (4) S. T. Crooke a B. Lebleu, „Antisense Research and Applications“, CRC Press (1993). Specifická vazebnost antisensních polynukleotidů na DNA nebo RNA cílové struktury může inaktivovat funkce spojené s DNA nebo RNA, jako jsou replikace, transkripce
20 nebo translace, a tím je umožňován mechanismus kontroly onemocnění, jako je rakovina a virová infekce. Proto může být vazebnost antisensních oligonukleotidů na cíl využita k měnění genové exprese v různých situacích, například k rušení životních cyklů virů nebo růstu kancerogenních buněk (C. A. Stein, Y. C. Cheng, Science, 1993, 261, 1004 až 1012). Kromě toho některé
25 oligonukleotidy se také pevně váží na cílové proteiny, takže působí jako inhibitory enzymů. Bock aj. popisují oligonukleotidy, které *in vitro* inhibují tvorbu fibrinové sraženiny katalyzovanou lidským thrombinem (L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, Nature, 1992, 355, 564 až 566). Ecker a j. popisují určité oligonukleotidy, které inhibují virus lidského prostého oparu při koncentraci pod 1,0 μmol . Polynukleotidy, které mají inhibiční vlastnosti na
30 enzymy, lze snadno nalézt použitím kombinatorické technologie (D. J. Ecker, T. A. Vickers, R. Hanecak, V. Driver, K. Anderson, Nucleic Acids Res., 1993, 21, 1853 až 1856).

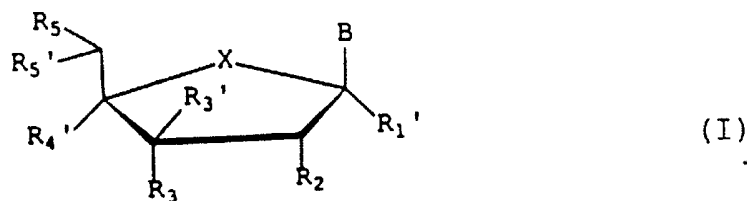
Byl popsán oligonukleotid, obsahující 5'-C-methyl-rozvětvený nukleosid, který vykazuje zvýšenou rezistenci vůči nukleáze (A. K. Saha a j., poster na 206. ACS konferenci, Chicago, 1993).
35 Byl také popsán oligonukleotid, obsahující 2'-O-methylnukleosidy, který vykazuje zlepšenou stabilitu vůči nukleasám a zvýšenou vazební afinitu na RNA (a) H. Inoue, Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka, Nucleic Acids Res., 1987, 15, 6131 a b) S. Shibahara, S. Mukai, H. Morisawa, H. Nakashima, S. Cobayashi, N. Yamamoto, Nucleic Acids Res., 1989, 17, 239). Byl také popsán oligonukleotid, obsahující 1'-substituovaný nukleosid, který vykazuje určitou
40 rezistenci vůči nukleáze (A. Ono, A. Dan, A. Matsuda, Bioconjugate Chemistry, 1993, 4, 499 až 508).

Kromě specifické vazební afinity ke komplementární sekvenci cílového polynukleotidu je žádoucí, aby antisensní oligonukleotidy vyhovovaly požadavkům pro terapeutické účely, například aby
45 vykazovaly účinnost, biologickou dostupnost, nízkou toxicitu a nízkou cenu. Protože oligonukleotidy s přírodním fosfodiesterovým skeletem jsou labilní k nukleázám a nepenetrují snadno buněčnou membránou, výzkum byl zaměřen na přípravu polynukleotidů s modifikovaným skeletem, které by zlepšily rezistenci k nukleázám a buněčnou absorpci. Hlavní nevýhoda oligonukleotidových analogů používaných pro antisensní aplikace spočívá v tom, že modifikované inter-
50 nukleotidové vazby eliminují aktivaci RNasy H antisensních oligonukleotidů, což degraduje RNA vlákno, ke kterému se oligonukleotidový analog váže. Proto je žádoucí připravovat polynukleotidové analogy, které zvyšují rezistenci vůči nukleázám a buněčnou absorpci, přičemž vlastnosti aktivace RNasy H zůstávají zachovány.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je nukleosid obecného vzorce I

5



ve kterém

10 R_2 znamená atom vodíku nebo hydroxyskupinu,

R_3 a R_5 znamenají nezávisle jeden na druhém hydroxyskupinu, *O*-2-kyanoethyl-(*N,N'*-diizopropyl)fosforamido-skupinu nebo hydroxyskupinu nesoucí ochrannou skupinu,

15 X znamená atom síry nebo skupinu NH ,

B znamená zbytek heterocyklické báze zvolené z množiny zahrnující adenin, guanin, xanthin, cytosin, uracil a thymin,

20 R_1' , R_3' , R_4' a R_5' znamenají nezávisle jeden na druhém atom vodíku, alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu s výhradou spočívající v tom, že všechny obecné substituenty R_1' , R_3' , R_4' a R_5' současně neznamenají atom vodíku,

25 přičemž

každá alkylová skupina ve významu obecných substituentů R_1' , R_3' , R_4' a R_5' je přímou nebo rozvětvenou, nasycenou nebo nenasyčenou alkylovou skupinou obsahující 1 až 10 uhlíkových atomů,

30

substituentová část substituované alkylové skupiny, substituované aralkylové skupiny a substituované arylové skupiny je zvolena z množiny zahrnující CN , NO_2 , N_3 , CF_3 , NH_2 , NR_2 , OH , OR , SH , $COOH$, $COOR$, SO_3R , F , Cl , Br a I , kde R znamená atom vodíku, alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, arylovou skupinu, acetylovou skupinu, trifluoracetylovou skupinu a tosylovou skupinu, a

35

arylová skupina ve významu obecných substituentů R_1' , R_3' , R_4' a R_5' znamená fenylovou skupinu nebo heterocyklickou skupinu obsahující 3 nebo 4 atomy, kde heteroatomem je atom kyslíku.

40

Výhodným nukleosidem podle vynálezu je nukleosid obecného vzorce I, ve kterém R_1' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_3' a R_4' a R_5' znamenají atom vodíku.

45

Výhodným nukleosidem podle vynálezu je nukleosid obecného vzorce I, ve kterém R_3' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu,

kylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_1' , R_4' a R_5' znamenají atom vodíku.

5 Výhodným nukleosidem podle vynálezu je nukleosid obecného vzorce I, ve kterém R_4' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_1' , R_3' a R_5' znamenají atom vodíku.

10 Výhodným nukleosidem podle vynálezu je nukleosid obecného vzorce I, ve kterém R_5' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_1' , R_3' a R_4' znamenají atom vodíku.

15 Předmětem vynálezu je rovněž oligonukleotid obsahující nukleosid obecného vzorce I, ve kterém R_1' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_3' a R_4' a R_5' znamenají atom vodíku.

20 Předmětem vynálezu je rovněž oligonukleotid obsahující nukleosid obecného vzorce I, ve kterém R_3' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_1' a R_4' a R_5' znamenají atom vodíku.

25 Předmětem vynálezu je rovněž oligonukleotid obsahující nukleosid obecného vzorce I, ve kterém R_4' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_1' a R_3' a R_5' znamenají atom vodíku.

30 Předmětem vynálezu je konečně oligonukleotid obsahující nukleosid obecného vzorce I, ve kterém R_5' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_1' a R_3' a R_4' znamenají atom vodíku.

35 Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 představuje oligonukleotidy podle vynálezu, ve kterých nukleosidové substituenty jsou substituovány pozitivně nabitými částmi.

40 Obr. 2 popisuje reakční schéma 1 pro syntézu 3'-C-rozvětveného thymidinu.

Obr. 3 popisuje reakční schéma 2 pro syntézu 3'-C-rozvětveného thymidinu.

45 Obr. 4 popisuje reakční schéma 3 pro syntézu 4'-C-rozvětveného thymidinu.

Obr. 5 popisuje další aspekty reakce podle schématu 3 pro syntézu 4'-C-rozvětveného thymidinu.

50 Obr. 6 popisuje reakční schéma 4 pro syntézu 4'-C-rozvětveného thymidinu.

Obr. 7 popisuje reakční schéma 5 pro syntézu 5'-C-rozvětveného thymidinu.

Obr. 8 popisuje reakční schéma 6 pro syntézu 5'-C-rozvětveného thymidinu.

Obr. 9 popisuje další aspekty reakce podle schématu 6 pro syntézu 5'-C-rozvětveného thymidinu.

5 Obr. 10 popisuje reakční schéma 7 pro syntézu 5'-C-rozvětveného thymidinu.

Obr. 11 popisuje reakční schéma 8 pro syntézu 5'-C-rozvětveného thymidinu.

Obr. 12 uvádí stereochemická přiřazení sloučeniny 44 a dalších.

10

Obr. 13 popisuje reakční schéma 9 pro syntézu 1'-C-rozvětveného thymidinu.

Obr. 14 popisuje reakční schéma 10 pro syntézu 1'-C-rozvětveného thymidinu.

15 Zkratky a definice

DMTr = 4,4'-dimethoxytrityl

CEPA = 2-kyanethyl-(*N,N'*-diizopropyl)fosforamido

TBDMS = *tert*-butyldimethylsilyl

20

Ac = acetyl

TBDMSM = *tert*-butyldimethylsilyloxymethyl

N₃ = azido

CF₃CO = trifluoracetyl

T_f = trifluormethansulfonyl

25

THP = tetrahydropyranyl

OTs = tosyl

30

Zde používaným výrazem „nukleosid“ se míní sloučenina obsahující purinovou nebo pyrimidinovou bázi (nebo jejich derivát) kovalentně připojenou k pětiuhlíkovému cyklickému cukru (furanóze), například ribóze, 2'-deoxyribóze a 2',3'-dideoxyribóze. Výraz „nukleosid“ je používán široce, takže zahrnuje nukleosidy s modifikovanou cukernou částí podle vynálezu.

35

Zde používaný výraz „polynukleotid“ znamená polymery obsahující dvě nebo více nukleosidových částí, kde každá nukleosidová část je připojena k jedné (terminální) nebo ke dvěma (vnitřním) ostatním nukleosidovým částem pomocí internukleosidových vazeb, jako jsou fosfodiesterové vazby, peptidové vazby, fosfonátové vazby, fosforothioátové vazby a pod. RNA a DNA jsou příklady polynukleotidů. Zde používaný výraz „polynukleotid“, pokud není uvedeno jinak, je užíván široce, takže zahrnuje polynukleotidy podle vynálezu modifikované v cukerné části molekuly.

40

Zde používaným výrazem „oligonukleotid“ se míní relativně malé polynukleotidy, například polynukleotidy se 2 až asi 50 základními páry bází v řetězci, avšak oligonukleotidy mohou být značně delší.

45

Výraz „skupina chránící hydroxyskupinu“ je znám odborníkům pracujícím v oboru organické chemie. Příklady skupin chránících hydroxyskupinu a jiných chránících skupin lze nalézt (mezi jiným) v Greene a Wuts, „Protective Groups in Organic Synthesis“, John Wiley & Sons, NY, NY (1991).

50

Zde používané výrazy „báze“ a „nukleosidová báze“ znamenají heterocyklické nukleotidové báze vyskytující se v přírodních nukleových kyselinách, jako je adenin, cytosin, hypoxanthin, uracil, thymin, guanin a jejich analogy, a také zahrnují přírodně se nevyskytující báze, které jsou schopné tvořit bazické páry s přírodně se vyskytujícími nukleotidovými bázemi. Jako tyto přírodně se

nevyskytující heterocyklické báze lze uvést, aniž by se však na tyto omezovaly, aza- a deaza-pyrimidinové analogy, aza- a deaza-purinové analogy, jakož i další analogy heterocyklických bází, kde jeden nebo více atomů uhlíku a dusíku purinových a pyrimidinových kruhů je substituován heteroatomy, například kyslíkem, sírou, selenem, fosforem a pod.

5

Podstatou vynálezu jsou nové nukleosidy a oligonukleosidy, které mají vhodné vlastnosti pro použití při antisensních, diagnostických a ostatních metodách využívajících oligonukleotidy. Sloučeniny podle vynálezu zahrnují různé nukleosidy, které jsou modifikovány tak, že obsahují substituenty v poloze C1', C3', C4' nebo C5' cukerné části nukleosidu. Nukleosidy podle vynálezu mohou obsahovat jeden nebo více substituentů tak, že upravují nukleosid pro syntézu v pevné fázi nebo podobné syntetické techniky, například tento nukleosid může být ve formě fosforamiditového derivátu s 5'-dimethoxytritylovou skupinou nebo s jinými chránicími skupinami. Podstatou vynálezu jsou také oligonukleotidy obsahující jeden nebo více nukleosidů s modifikovanou cukernou částí podle vynálezu v řetězci nukleové kyseliny.

15

Přidáním vhodného substituentu v polohách C3' nebo C5' nukleosidu se mění okolí okolo fosfodiesterového skeletu oligonukleotidu obsahujícího tento nukleosid s modifikovanou cukernou částí. Výhodně se používá objemný substituent v polohách C3' nebo C5', čímž se inhibují nežádoucí interakce s enzymy nebo jejich aktivními místy. Předpokládá se, že tyto C3' nebo C5' substituenty činí fosfodiesterový skelet oligonukleotidů nepřístupným pro mnoho enzymů. Výsledkem přítomnosti těchto substituentů je, že oligonukleotidy obsahující tyto C3' nebo C5' rozvětvené nukleosidy mohou být více rezistentní vůči nukleázám ve srovnání s DNA nebo RNA. Substituenty v polohách C1' a C4' nukleosidů mohou vyvolávat stejné žádoucí účinky jako substituenty v polohách C3' a C5' nukleosidů. U oligonukleotidů podle vynálezu obsahujících pozitivně nabitě aminoalkylovou skupinou modifikované cukry se výsledný negativní náboj za fyziologických podmínek snižuje, takže dvojité šroubovice vytvořená alespoň jedním vláknem těchto oligonukleotidů může být mnohem stabilnější než u odpovídajícího nemodifikovaného oligonukleotidu (viz obr. 1). Takže vazebná afinita mezi oligonukleotidy podle vynálezu, které obsahují aminoalkylovou skupinou modifikované cukry nebo podobně pozitivně nabitě substituenty, a polynukleotidovým hybridizačním terčem se může zlepšit pozitivním nábojem. Odborníci pracující v oboru ocení, že při provádění a navrhování dalších provedení vynálezu nemusí být výše uvedené teorie korigovány za účelem provádění nebo použití zde popsáního vynálezu.

35

Nukleosidy s modifikovanou cukernou částí podle vynálezu se mohou připravovat podle příkladů, které jsou dále uvedeny v příkladové části. Odborník pracující v organické chemii může syntetizovat řadu sloučenin podle vynálezu, které zde nejsou explicitně uvedeny v příkladech.

Oligonukleotidy obsahující nukleosidy s modifikovanou cukernou částí molekuly.

40

Polynukleotidy podle vynálezu obsahují jeden nebo více nukleosidů s modifikovanou cukernou částí podle vynálezu, kde nukleosid s modifikovanou cukernou částí podle vynálezu je připojen buď na druhý nukleosid s modifikovanou cukernou částí, nebo na nemodifikovaný nukleosid, přičemž nukleosidy jsou dohromady spojeny internukleosidovou vazbou. Jako nukleosidy s modifikovanou cukernou částí vhodné pro zabudování do oligonukleotidů podle vynálezu lze uvést sloučeniny vzorců 45, 46, 47 a 48. Analogy polynukleotidů podle vynálezu nejsou omezeny počtem možných nukleosidových podjednotek v jednotlivém analogu polynukleotidu, avšak je obecně vhodnější syntetizovat krátké analogy polynukleotidů, například analogy polynukleotidů obsahující méně než 50 bází.

50

Jednotlivé nukleosidy podle vynálezu mohou být spojeny navzájem pomocí internukleosidových vazeb, takže se připraví nové oligonukleotidy mající požadovanou sekvenci nukleosidových bází. Internukleosidovými vazbami může být vazba C3' na C5' nebo vazba C2' na C5'. Zde používaný výraz "internukleosidová vazba" se netýká pouze typu fosfodiesterového skeletu, který tvoří internukleosidové vazby v DNA (dideoxyribonukleová kyselina) a RNA (ribonukleová kyselina),

ale také různých jiných molekulových částí, které slouží stejné strukturní funkci jako fosfodiesterové vazby v DNA a RNA. Jako příklady dalších internukleosidových vazeb vhodných pro oligonukleotidy podle vynálezu lze uvést fosforothioáty, methylfosfonáty, fosforodithioáty, borfosfonáty, selenofosfonáty, fosforamidáty, acetamidáty a pod. Popisy syntézy a použití různých internukleosidových vazeb lze nalézt, mezi jiným, v patentu US 5 256 775, PCT publikaci WO 93/24 507, PCT publikaci WO 92/05 186, patentu US 5 264 562, PCT publikaci WO 92/02 534, PCT publikaci WO 94/06 811, PCT publikaci WO 93/17 717, patentu US 5 212 295, patentu US 5 292 875, patentu US 5 218 103, patentu US 5 166 387, patentu US 5 151 516, patentu US 4 814 448, patentu US 4 814 451, patentu US 4 096 210, patentu US 4 09 873, patentu US 4 092 312, patentu US 4 016 225, patentu US 4 008 197 a pod.

Polynukleotidy podle vynálezu mající požadovanou sekvenci bází lze snadno připravit za použití syntetických technik polymerace nukleových kyselin, jak je odborníkům z organické chemie dobře známo. Polynukleotidy podle vynálezu se s výhodou syntetizují za použití chemie fosforamiditů, čímž se zabuduje jeden nebo více nových nukleosidů podle vynálezu do analogu polynukleotidu. Rozvětvené substituenty v polohách C3' nebo C5' nukleosidů podle vynálezu mohou snižovat stupeň interakce v závislosti na velikosti substituentů. Proto u některých objemných substituentů rozvětvených nukleosidů musí být doba interakce prodloužena až desetkrát nebo ještě více. Je-li to zapotřebí, lze pro zvýšení stupně interakce použít opakování této interakce s čerstvými reakčními složkami a lze také použít koncentrovanější reakční složky. Po syntéze mohou být oligonukleotidy zpracovány stejným způsobem jako standardní nemodifikované oligonukleotidy, to je odštěpením z pevných nosičů za použití 30% amoniaku, odstraněním chránicích skupin při teplotě pod 55 °C po dobu 8 hodin a čištěním pomocí HPLC s obrácenými fázemi.

Za účelem ověření jak čistoty oligonukleotidů, tak zabudování požadovaného nukleosidu s modifikovanou cukernou částí jsou vyčištěné oligonukleotidy charakterizovány analýzou produktů vzniklých při degradaci oligonukleotidů štěpením za použití enzymů, jako je fosfodiesteráza z hadího jedu a bakteriální alkali-fosfatáza. Degradací produkty se potom podrobí HPLC analýze (nebo jiným separačním technikám) a srovnání s autentickými vzorky nukleosidů. Strukturu vyčištěných oligonukleotidů lze také ověřovat hmotnostní spektroskopií použitím elektrospray techniky.

Dále jsou podstatou vynálezu konjugáty oligonukleotidů s modifikovanou cukernou částí. K polohám C1', C3', C4' a C5' nárokováných nukleosidů mohou být připojeny aminoskupiny, hydroxyskupiny, thioskupiny nebo karboxyalkylové skupiny, takže se zajistí poloha pro konjugaci žádané části na oligonukleotid. Substituenty vázané v polohách C1' a C3' mohou být použity pro usměrnění konjugující se části na menší žlábký dvouvláknové nukleové kyseliny, zatímco substituenty vázané v poloze C4' mohou být použity pro usměrnění konjugující se části na větší žlábký. Substituenty vázané v poloze C5' mohou být použity pro usměrnění konjugované části buď na větší, nebo na menší žlábký dvouvláknové nukleové kyseliny, a to v závislosti na stereochemii substituentů v poloze C5'. Těmito substituenty lze vázat a umístit do požadované polohy mnoho funkčních částí, jako jsou syntetická nukleáza, síťovací činidla, činidla pro vymezení a značení molekuly.

Použitelnost a aplikace

Protože oligonukleotidy podle vynálezu jsou schopné významné jednovláknové nebo dvouvláknové vazebné reakce s cílovou nukleovou kyselinou za vzniku duplexů, triplexů nebo jiných forem stabilních asociátů s přírodními polynukleotidy a jejich strukturními analogy, mohou se oligonukleotidy podle vynálezu použít v převážné části postupů, které používají konvenční oligonukleotidy. Oligonukleotidy podle vynálezu se tak mohou použít například jako polynukleotidové hybridizační sondy, iniciátory pro polymerázové řetězové reakce (a obdobné cyklické amplifikační reakce), sekvenční iniciátory a pod. Oligonukleotidy podle vynálezu se mohou také použít

v diagnostice a terapii onemocnění. Terapeutické aplikace oligonukleotidů podle vynálezu zahrnují specifické inhibice exprese genů (nebo inhibice translace RNA sekvencí kódovaných těmito geny), které jsou spojeny buď se založením, nebo udržováním patologických stavů použitím antisensních oligonukleotidů. Oligonukleotidy podle vynálezu se mohou použít pro zprostředkování antisensní inhibice řady genetických cílů. Jako příklady genů nebo RNA kódovaných těmito geny, které mohou být cíleny působením antisensních oligonukleotidů, lze uvést oligonukleotidy, které kódují enzymy, hormony, sérové proteiny, transmembránové proteiny, adhezni molekuly (LFA-1, GPIIb/IIIa, ELAM-1, VACM-1, ICAM-1, E-selektin a pod.), receptorové molekuly, včetně receptorů cytokinu, cytokiny (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 a pod.), onkogeny, růstové faktory a interleukiny. Cílové geny nebo RNA mohou být asociovány s jakýmkoliv patologickým stavem, jako jsou ty, které jsou spojeny se zánětlivými stavy, kardiovaskulárními poruchami, imunitními reakcemi, rakovinou, virovými infekcemi, bakteriálními infekcemi, infekcemi způsobenými kvasinkami, infekcemi způsobenými parazity a pod.

Oligonukleotidy podle vynálezu jsou vhodné pro použití při terapeutických aplikacích jak *in vivo*, tak *ex vivo*. Indikace pro *ex vivo* použití zahrnují ošetřování buněk, jako jsou kostní dřeň nebo periferní krev, ve stavech, jako je leukemie (chronická myelomatičká leukemie, akutní lymfocytická leukemie) nebo virová infekce. Cílové geny nebo RNA kódované těmito geny tak mohou sloužit jako cíle pro léčení rakoviny, včetně onkogenů, jako jsou *ras*, *k-ras*, *bcl-2*, *c-myc*, *bcr*, *c-myc*, *c-abl*, nebo hyperexpresních sekvencí, jako jsou *mdm2*, *oncostatin M*, *IL-6* (Kaposiho sarkom), *HER-2*, a translokací, jako je *bcr-abl*. Vhodnými cílovými objekty jsou také virové genové sekvence nebo RNA kódované těmito geny, jako jsou polymerázové nebo reverzní transkriptázové geny herpesvirů, jako jsou CMV, HSV-1, HSV-2, retrovirů, jako jsou HTLV-1, HIV-1, HIV-2, nebo jiných DNA nebo RNA virů, jako jsou HBV, HPV, VZV, virus chřipky, adenoviry, flaviviry, rhinoviry a pod. Aplikace specificky vázaných oligonukleotidů se může použít ve spojení s jiným terapeutickým ošetřením. Další terapeutická použití pro oligonukleotidy podle vynálezu zahrnují (1) modulaci zánětlivých reakcí modulováním genové exprese, jako jsou IL-1 receptor, IL-1, ICAM-1 nebo E-selektin, které hrají roli při zprostředkování zánětu a (2) modulaci buněčného dělení ve stavech, jako jsou arteriální okluze (restenóza) po angioplastice modulováním exprese (a) růstu mitogenních faktorů, jako jsou nesvalový myosin, *myc*, *fox*, PCNA, PDGF nebo FGF nebo jejich receptory, nebo (b) faktorů buněčného dělení, jako je *c-myc*. Ostatní vhodné faktory proliferace nebo faktory signální transdukce, jako jsou TGF α , IL-6, gINF, proteinkináza C, tyrosinkinázy (jako p210, p190), mohou být cíle pro léčení psoriázy a jiných stavů. Kromě toho receptor EGF, TGF α nebo MHC alely mohou být cíle u autoimunních onemocnění.

Oligonukleotidy podle vynálezu mohou s výhodou nahrazovat konvenční oligonukleotidy v mnoha ne-terapeutických technikách, jako jsou hybridizace pro detekci sekvencí nukleových kyselin, polymerázové řetězové reakce a pod. Tyto ne-terapeutické techniky jsou dobře známy odborníkům v oboru molekulární biologie a lze je najít například v Sambrook a j., *Molecular Cloning Techniques* 2. vydání, Clod Spring Harbor (1989).

Inkorporace oligonukleotidů podle vynálezu do buněk se může zvýšit jakoukoliv vhodnou metodou, včetně přenosem fosforečnanem vápenatým, DMSO, glycerolem nebo dextranem, nebo použitím kationtových, aniontových a/nebo neutrálních lipidických směsí nebo liposomů použitím metod popsanych v publikacích (WO 90/14 074, WO 91/16 024, WO 91/17 424, patentu US 4 897 355). Oligonukleotidy mohou být zaváděny do buněk komplexací s kationtovými lipidy, jako je DOTMA (který může být nebo nemusí být ve formě liposomů), přičemž komplex se potom uvede ve styk s buňkami. Vhodnými kationtovými lipidy, avšak neomezenými pouze na ně, jsou *N*-(2,3-di(9-(*Z*)-oktadecenyloxy)-prop-1-yl)-*N,N,N*-trimethylamonium (DOTMA) a jeho soli, 1-*O*-oleyl-2-*O*-oleyl-3-dimethylaminopropyl- β -hydroxyethylamonium a jeho soli a 2,2-bis(oleyloxy)-3-(trimethylamonio)propan a jeho soli.

Zvýšená inkorporace oligonukleotidů podle vynálezu může být také zprostředkována použitím (1) virů, jako je Sendai vir (R. Bartzatt, *Biotechnol Appl Biochem.*, 1989, 11, 133 až 135) nebo

adenovir (E. Wagner a j., Proc Nat. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 6099 až 6013), (2) polyaminu nebo polykationtových konjugátů za použití sloučenin, jako jsou polylysin, protamin nebo Na, N₁₂-bis-(ethyl)spermin (E. Wagner a j. Proc. Natl Acad Sci. USA, 1991, 88, 4255 až 4259, M. Zenke a j. Proc Natl Acad Sci. USA, 1990, 87, 3655 až 3659, B. K. Chank a j., Biochem Biophys Res Commun., 1988, 157, 264 až 270, patent US 5 138 045), (3) lipopolyaminových komplexů za použití sloučenin, jako je lipospermin (J. P. Behr a j., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6982 až 6986, J. P. Loeffler a j., J. Neurochem., 1990, 54, 1812 až 1815), (4) aniontových, neutrálních nebo na pH citlivých lipidů za použití sloučenin včetně aniontových fosfolipidů, jako jsou fosfatidylglycerol, kardiolipin, fosfatidová kyselina nebo fosfatidylethanolamin (K. D. Lee a j., Biochem Biophys Acta, 1992, 1103, 185 až 197, G. Cheddar a j., Arch Biochem Biophys, 1992, 294, 188 až 192, T. Yoshimura a j., Biochem Int., 1990, 20, 697 až 706), (5) konjugátů se sloučeninami, jako jsou transferrin nebo biotin, nebo (6) konjugátů s proteiny (včetně albuminu nebo protilátek), glykoproteiny nebo polymery (včetně polyethylenglykolu), které zvyšují farmakokinetické vlastnosti oligonukleotidů. Zde používaný výraz přenos znamená jakoukoliv metodu, která je vhodná pro dodání oligonukleotidů do buněk. Jakékoliv činidlo, jako je lipid, nebo jiné činidlo, jako je vir, která se mohou použít při postupech přenosu, se zde jednotně nazývají jako „činidlo zvyšující permeabilitu“. Dopravení oligonukleotidů do buněk může být součástí přenosu s jinou nukleovou kyselinou, jako jsou (1) expresovatelné DNA fragmenty zakódované proteinem nebo proteiny nebo fragmenty proteinu nebo (2) translatovatelné RNA, které zakódovávají protein nebo proteiny nebo proteinový fragment.

Oligonukleotidy podle vynálezu se tak mohou inkorporovat do vhodných formulací, které zvyšují přenos oligonukleotidů do buněk. Vhodnými farmaceutickými formulacemi jsou také ty, které se běžně používají při aplikacích sloučenin, při kterých se sloučeniny přenášejí do buněk nebo tkání topickou aplikací. V topických preparátech obsahujících oligonukleotidy se mohou použít sloučeniny, jako jsou polyethylenglykol, propylenglykol, azon, nonoxonyl-9, olejová kyselina, DMSO, polyaminy nebo lipopolyaminy.

Syntéza 3'-rozvětvených nukleosidů

Náhrada hydroxylové skupiny na C3' nukleosidech za jiné funkční skupiny za zachování vodíku v poloze C3' byla již popsána, mezi jiným v práci E. De Clercq, Antiviral Res., 1989, 12, 1 až 20. Náhrada vodíku na C3' nukleosidech za jiné funkční skupiny je popsána v práci I. I. Fedorov, E. M. Kazmina, N. A. Novicov, G. V. Gurskaya, A. V. Bocharov, M. V. Jasko, L. S. Victorova, M. K. Kuhkanova, J. Balzarini, E. De Clercq, J. Med. Chem., 1992, 35, 4567 až 4575. Předložený vynález popisuje postupy pro přípravu velkého počtu různých 3'-C-rozvětvených nukleosidů. Příklady těchto postupů pro přípravu 3'-C-rozvětvených thymidinů jsou uvedeny v reakčních schématech 1 a 2 (obr. 2 a 3). Tyto postupy se mohou snadno upravit pro syntézy ostatních nukleosidů podle vynálezu, včetně těch provedení vynálezu, ve kterých nukleosidy obsahují jiné báze než thymin. Sloučenina 4 se připraví ve třech stupních z thymidinu, jak je popsáno (P. N. Jorgensen, H. Thrane, J. Wengel, J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 2231). Reakcí sloučeniny 4 s tosylchloridem v pyridinu se získá tosylát, sloučenina 5. Reakcí sloučeniny 5 s kyanidem draselným v DMF se získá derivát 3'-C-kyanmethylthymidinu, sloučenina 6. Reakcí sloučeniny 5 s azidem sodným v DMF se získá derivát 3'-C-azidomethylthymidinu, sloučenina 7. Podobně se reakcemi sloučeniny 5 s různými nukleofilními reakčními činidly získá celá řada derivátů 3'-C-rozvětveného thymidinu, ve kterých má 3'-C-hydroxylová skupina zachování stejnou orientaci, jaká je v thymidinu. Reakcí sloučeniny 6 s 2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylchlorosforamidem a diizopropylethylaminem v dichlormethanu se získá fosforamidit, sloučenina 8, která je stavební jednotkou pro syntézu oligonukleotidů. Sloučenina 7 se nechá reagovat stejným způsobem a získá se sloučenina 9. Podobně se další 3'-C-rozvětvené thymidinové deriváty mohou převést na odpovídající fosforamidity standardním postupem (F. Eckstein, „Oligonucleotide Synthesis“, Oxford University Press (1991)). Reakcí sloučeniny 5 s hydridem sodným v THF se získá epoxidový derivát, sloučenina 10. Reakcí sloučeniny 10 s lithiualuminiumhydridem v THF se získá derivát 3'-C-methylthymidinu, sloučenina 11, která se převede na

fosforamidit, sloučeninu 12. Reakcí sloučeniny 10 s amoniakem v methanolu se získá derivát 3'-C-aminomethylthymidinu, sloučenina 13, která se nechá reagovat s ethylthiotrifluoroacetátem v THF a získá se derivát s chráněnou aminoskupinou, sloučenina 14. Sloučenina 14 se převede na fosforamidit, sloučeninu 15. Podobně se reakcí sloučeniny 10 s různými nukleofilními činidly získá celá řada 3'-C-rozvětvených thymidinových derivátů, ve kterých si 3'-C-hydroxylová skupina zachovává stejnou orientaci, jakou má thymidin, protože nukleofily atakují méně chráněný uhlík epoxidového kruhu. Takže reakcí sloučeniny 10 s alkoholy v přítomnosti báze se získají alkoxyethylthymidiny. Pro přípravu 3'-C-substituovaných alkoxyethylthymidinů lze také použít substituované alkoholy. Jako substituenty přicházejí v úvahu skupiny NO₂, CN, COOEt a skupiny chránící aminoskupinu, avšak neplatí to jako omezení na tyto substituenty. Reakcí sloučeniny 10 s dioly se získají 3'-C-hydroxyalkoxyethylthymidiny, které lze snadno převést na 3'-C-halogenalkoxyethylthymidiny. Reakcí sloučeniny 10 s nitromethanem se získá 3'-C-nitroethylthymidin. Redukcí 3'-C-nitroalkylthymidinů se získají 3'-C-aminoalkylthymidiny. Reakcí sloučeniny 10 s organokadmiovými činidly substituovanými kyanoskupinou se získají 3'-C-kyanalkylthymidiny. Reakcí sloučeniny 10 s ethoxykarbonylalkylzinkovými činidly se získají 3'-C-ethoxykarbonylalkylthymidiny, které se snadno hydrolyzují na 3'-C-karboxyalkylthymidiny za bazických podmínek.

Pro některé reakce, včetně s lithiiumorganokuprátovými činidly, je třeba chránit amidovou skupinu thyminu. Jako chránící skupinu je výhodné použít *tert*-butyldimethylsilyloxymethylovou skupinu (TBDMSM), protože ji lze snadno odstranit tetrabutylamoniumfluoridem (TBAF) po následných transformacích. N-TBDMSM skupinu lze zavést reakcí 3,5-diacylovaného thymidinu s *tert*-butyldimethylsilyloxymethylchloridem v pyridinu. N-TBDMSM-thymidin se podrobí obdobné reakci, jak je výše popsáno pro thymidin, a získá se tosylát, derivát sloučeniny 5, a epoxid, derivát sloučeniny 10, přičemž obě tyto sloučeniny lze použít pro přípravu 3'-C-alkylthymidinů a 3'-C-alkenylthymidinů reakcí s lithiovými činidly. Hydroborací nebo oxidačním štěpením vzniklých 3'-C-(ω -alkenyl)thymidinů se získají hydroxyalkylthymidiny, jejichž hydroxylová skupina se může převést na různé funkční skupiny, jako jsou NH₂, OR, SR, SH a X, kde R je atom vodíku nebo alkylová skupina a X je atom fluoru, chloru, bromu, jodu nebo skupina OTs.

Syntéza 4'-C-rozvětvených nukleosidů

Řada 4'-C-rozvětvených nukleosidů je již popsána v práci C. O-Yang, H. Y. Wu, E. B. Fraser-Smith, K. A. M. Walker, Tetrahedron Letts., 1992, 33, 37 až 40. Tento vynález popisuje postupy pro přípravu mnoha nových 4'-C-rozvětvených nukleosidů. Příprava 4'-C-rozvětvených thymidinů je znázorněna v reakčních schématech 3, 4 a 5 (obr. 4, 5, 6 a 7). Tyto postupy se mohou snadno upravit pro syntézy ostatních nukleosidů podle vynálezu, včetně těch provedení vynálezu, ve kterých nukleosidy obsahují jiné báze než thymin. Sloučenina 16, připravená z thymidinu, se nechá reagovat dimethoxytritylchloridem a získá se sloučenina 17. *Tert*-butyldimethylsilylová skupina (TBDMS) sloučeniny 17 se odstraní reakcí s TBAF a získá se sloučenina 18, která se oxiduje na aldehyd, sloučeninu 19, reakcí s dimethylsulfoxidem, DCC, trifluoroctovou kyselinou a pyridinem. Sloučenina 19 se převede na sloučeninu 20, 4'-C-hydroxymethylthymidinový derivát, postupem podobným popsaným postupům (a. C. O-Yang, H. Y. Wu, E. B. Fraser-Smith, K. A. M. Walker, Tetrahedron Letts, 1992, 33, 37 až 40, b. G. H. Jones, M. Taniguchi, D. Tegg, J. G. Moffatt, J. Org. Chem., 1979, 44, 1309 až 1317). Dimethoxytritylová skupina sloučeniny 20 se odstraní 80% kyselinou octovou a získá se sloučenina 21, 4'-C-hydroxymethylthymidin. Selektivní benzoylaci sloučeniny 21 benzoylanhydridem se získá sloučenina 22, jejíž 3'- a 5'-hydroxylové skupiny se chrání tetrahydropyranylovou skupinou (THP) reakcí sloučeniny 22 s dihydropyranem v přítomnosti toluensulfonové kyseliny v dichlormethanu. Vzniklá sloučenina 23 se nechá reagovat s vodným hydroxidem sodným a získá se sloučenina 24, která se nechá reagovat s methyljodidem v přítomnosti hydroxidu sodného při teplotě 0 °C a získá se 4'-C-methoxymethylthymidinový derivát, sloučenina 25. Odstraněním chránících THP skupin ze sloučeniny 25 se získá sloučenina 26, 4'-C-methoxymethylthymidin. Pro některé reakce jsou

výhodnější TBDMS chránicí skupiny než THP, protože THP způsobují tvorbu diastereoizomerů. Takže reakcí sloučeniny 22 s *tert*-butyldimethylchlorosilanem se získá 3',5'-O-(bis-TBDMS)-thymidinový derivát, sloučenina 27. Odstraněním benzoylové skupiny ethylendiaminem při teplotě 50 °C se získá sloučenina 28, která se nechá reagovat s anhydridem trifluormethan-sulfonové kyseliny a pyridinem v dichlormethanu a získá se triflát, sloučenina 29. Reakcí sloučeniny 29 s amoniakem v dioxanu se získá 4'-C-aminomethylthymidinový derivát, sloučenina 30. Reakcí sloučeniny 29 s azidem sodným v DMF se získá 4'-C-azidomethylthymidinový derivát, sloučenina 31. Odstraněním TBDMS chránicích skupin ze sloučenin 30 a 31 se získají sloučeniny 32 a 33, 4'-C-aminomethylthymidin a 4'-C-azidomethylthymidin. Aminoskupina sloučeniny 33 se chrání trifluoracetylovou skupinou a vznikne sloučenina 34. Reakcí sloučenin 32 a 34 s dimethoxytritylchloridem v pyridinu se získají sloučeniny 35 a 36. Sloučeniny 35 až 36 se převedou na odpovídající fosforamidity, sloučeniny 37 a 38, reakcí s 2-kyanethyl-N,N-diizopropylchlorfosforamidem.

Reakcemi sloučeniny 29 s Grignardovými činidly se získají 4'-C-alkylthymidiny a 4'-C-alkenylthymidiny. Hydroborací a oxidačním štěpením vzniklých 4'-C-(ω -alkenyl)thymidinů se získají hydroxyalkylthymidiny, jejichž hydroxylová skupina se může převést na různé funkční skupiny, jako jsou NH₂, OR, SR, SH a X, kde R je atom vodíku nebo alkylová skupina a X je atom fluoru, chloru, bromu, jodu nebo skupina OTs. Reakcemi sloučeniny 29 s kyanalkyl-kadmiem se získají 4'-C-kyanalkylthymidiny. Reakcemi sloučeniny 29 s ethoxykarbonylalkyl-zinkovými činidly se získají 4'-C-ethoxykarbonylalkylthymidiny, které se mohou hydrolyzovat na 4'-C-karboxyalkylthymidiny. Reakcemi sloučeniny 29 s alkoxidy sodnými se získají 4'-C-alkoxymethylthymidiny. Pro přípravu 4'-C-substituovaných alkoxymethylthymidinů se mohou použít substituované alkoholy a fenoly. Substituenty mohou být skupiny NO₂, CN, COOEt, OAc nebo skupiny chránící aminoskupinu. Po skončení syntézy 4'-C-rozvětvených thymidinů se 5'-hydroxylové skupiny chrání dimethoxytritylovou skupinou a 3'-hydroxylové skupiny se převedou na fosforamidit pro syntézu oligonukleotidu standardním postupem (F. Eckstein, „Oligonucleotide Synthesis“, Oxford University Press (1991)).

30 Syntéza 5'-C-rozvětvených nukleosidů

Předložený vynález popisuje postupy pro přípravu řady 5'-C-rozvětvených nukleosidů. Příklady postupů pro přípravu 5'-C-rozvětvených thymidinů jsou znázorněny v reakčních schématech 6, 7 a 8 (obr. 8, 9 a 10). Tyto postupy se mohou snadno upravit pro syntézy ostatních nukleosidů podle vynálezu, včetně těch provedení vynálezu, ve kterých nukleosidy obsahují jiné báze než thymin. Sloučenina 42 se připraví třístupňovým známým postupem (C. O-Yang, H. Y. Wu, E. B. Fraser-Smith, K. A. M. Walker, Tetrahedron Letts., 1992, 33, 37 až 40). Alternativně se sloučenina 42 připraví reakcí 80% kyseliny octové se sloučeninou 41, 3',5'-O-(bis-*tert*-butyldimethylsilyl)thymidinem připraveným reakcí thymidinu s nadbytkem *tert*-butyldimethylchlorosilanem a imidazolem v pyridinu. Wittigovou reakcí sloučeniny 42 s fosforylidem, připraveným z methyltrifenylfosfoniumbromidu a hydridu sodného v DMSO, se získá olefinický derivát, sloučenina 43. Epoxidací sloučeniny 43 *m*-chlorperoxybenzoovou kyselinou v dichlormethanu se získá 5'-(*S*)-epoxidový derivát, sloučenina 44, jakožto hlavní produkt, a 5'-(*R*)-epoxidový derivát jakožto minoritní produkt. Stereochemická přiřazení sloučeniny 44 a dalších sloučenin jsou uvedena ve schématu 1 (obr. 12). Reakcí sloučeniny 44 s methanolem v přítomnosti uhličitanu sodného se získá 5'-(*S*)-C-methoxymethylthymidin, sloučenina 45. Reakcí sloučeniny 44 s amoniakem v methanolu se získá 5'-(*S*)-C-aminomethylthymidin, který se chrání trifluoracetylovou skupinou za vzniku sloučeniny 46. Reakcí sloučeniny 44 s kyanidem draselným v DMF se získá 5'-(*S*)-C-kyanmethylthymidin, sloučenina 47. 5'-hydroxylové skupiny sloučenin 45 až 47 se chrání dimethoxytritylovou skupinou reakcemi s dimethoxytritylchloridem a trifluormethan-sulfonátem stříbrným v pyridinu, čímž se získají sloučeniny 48 až 50. TBDMS skupiny se ze sloučenin 48 až 50 odstraní reakcí s TBAF v THF a získají se sloučeniny 51 až 53. Sloučeniny 51 až 53 se převedou na odpovídající fosforamidity, sloučeniny 54 až 56. Grignardovou reakcí

sloučeniny 42 s allylmagneziumbromidem se získá směs izomerních derivátů 5'-(*R*)-C-allylthymidinu a 5'-(*S*)-C-allylthymidinu, sloučeniny 57 a 58, které se rozdělí chromatografií na silikagelu. TBDMS skupiny ze sloučenin 57 a 58 se odstraní reakcí s TBAF v THF a získají se 5'-(*R*)- a 5'-(*S*)-C-allylthymidiny, sloučeniny 59 a 60. Sloučeniny 59 a 60 se převedou na odpovídající fosforamidity, sloučeniny 61 a 62. Podobně reakcemi sloučeniny 42 s různými Grignardovými činidly se získají různé 5'-(*S* nebo *R*)-C-alkylthymidiny a 5'-(*S* nebo *R*)-C-alkenylthymidiny. Hydroborací nebo oxidačním štěpením vzniklých 5'-C-(ω -alkenyl)thymidinů se získají hydroxyalkylthymidiny, jejichž hydroxylovou skupinu lze převést na různé funkční skupiny, jako jsou NH₂, OR, SR, SH a X, kde R je atom vodíku nebo alkylová skupina a X je atom fluoru, chloru, bromu, jodu nebo skupina OTs.

Reakcemi sloučeniny 44 s různými nukleofilními činidly lze získat různé deriváty 5'-C-rozvětveného thymidinu. Tak reakcemi sloučeniny 44 s alkoholy v přítomnosti báze se získají 5'-C-alkoxymethylthymidiny. Pro přípravu 5'-C-substituovaných alkoxymethylthymidinů lze také použít substituované alkoholy. Jako substituenty lze uvést NO₂, CN, COOEt a skupiny chránící aminoskupinu, avšak není to omezeno pouze na tyto skupiny. Reakcí sloučeniny 44 s dioly se získají 5'-C-hydroxyalkoxymethylthymidiny, které lze snadno převést na 5'-C-halogenalkylthymidiny. Reakcí sloučeniny 44 s nitromethanem se získá 5'-C-nitroethylthymidin. Redukcí 5'-C-nitroalkylthymidinů vznikají 5'-C-aminoalkylthymidiny. Reakcí sloučeniny 44 s kyanalkylkadmiovými reakčními činidly se získají 5'-C-kyanalkylthymidiny. Reakcí sloučeniny 44 s ethoxykarbonylalkylzinkovými reakčními činidly se získají 5'-C-ethoxykarbonylalkylthymidiny, které se snadno hydrolyzují za bazických podmínek na 5'-C-karboxyalkylthymidiny. Všechny tyto přeměny 5'-(*S*)-izomerů lze stejně tak provádět s 5'-(*R*)-izomery. Konečně reakcemi 5'-C-rozvětvených thymidinů s dimethoxytritylchloridem a triflátem stříbrným v pyridinu se získají 5'-O-DMTr-5'-C-rozvětvené thymidiny, které lze převést na odpovídající fosforamidity standardním postupem (F. Eckstein, „Oligonucleotide Synthesis“, Oxford University Press (1991)).

Pro stanovení konfigurací v C5' polohách 5'-C-rozvětvených thymidinů lze využít výhody zvýšení NOE stéricky bráněných protonů. Protože pro NOE pokusy jsou podstatné rigidní orientace substituentů v poloze C5', zavádí se mezi 3'-O- a 5'-O-thymidinové deriváty TIPDS-kruh (schéma 8, obr. 11), kde 5'-protony jsou orientovány buď směrem k 3'-protonům, nebo směrem od 3'-protonů. Jsou-li 3'-protony nasyceny, lze snadno pozorovat přítomnost nebo nepřítomnost NOE zvýšení 5'-protonů (schéma 1, obr. 12). Pro 5'-C-allylthymidiny izomer, který má NOE zvýšení 4,8 %, je jasně 5'-(*R*)-izomerem a druhý, který nemá NOE zvýšení, je 5'-(*S*)-izomerem. Bez rentgenové strukturní krystalografie je přímé určení stereochemie 5'-epoxyskupiny problémem. Avšak převáděním epoxidů na produkty s otevřeným kruhem se nemění chiralita v poloze C5'. Je-li stanovena stereochemie jednoho páru takovýchto produktů s otevřeným kruhem, je také přiřazena stereochemie epoxidového páru. Tak podobně jako u 5'-C-allylthymidinů, dvojice produktů vzniklých otevřením kruhu, 5'-C-kyanmethylthymidinů, připravených z epoxidů, se převedou na TIPDS cyklické produkty. Jsou-li 3'-protony nasycené, jeden izomer má NOE zvýšení 6,3 %. Nepochybně je tento izomer 5'-(*R*)-izomerem a druhý je 5'-(*S*)-izomerem.

Syntéza 1'-C-rozvětvených nukleosidů

Některé 1'-C-rozvětvené nukleosidy jsou již popsány (a. V. Uteza, G. R. Chen, J. L. Q. Tuoi, G. Descotes, B. Fenet, A. Grouiller, Tetrahedron, 1993, 49, 8579 až 8588, b. A. Azhayev, A. Gouzaev, J. Hovinen, E. Azhayeva, H. Lonnberg, Tetrahedron Letts., 1993, 34, 6435 až 6438). Předložený vynález popisuje přípravu velkého množství 1'-C-rozvětvených nukleosidů. Příprava 1'-C-rozvětvených thymidinů je znázorněna v reakčních schématech 9 a 10 (obr. 13 a 14). Sloučenina 63 se připraví známým postupem (V. Uteza, G. R. Chen, J. L. W. Tuoi, G. Descotes, B. Fenet, A. Grouiller, Tetrahedron, 1993, 49, 8579 až 8588). 5'-hydroxylová skupina ve sloučenině 63 se chrání dimethoxytritylovou skupinou, čímž se získá sloučenina 64,

která se nechá reagovat s *tert*-butyldimethylchlorsilanem za vzniku sloučeniny 65. Reakcí sloučeniny 65 s *tert*-butyldimethylsilyloxymethylchloridem se získá sloučenina 66. Reakcí sloučeniny 66 s lithiumtriethoxyaluminiumhydridem v etheru se získá aldehyd, sloučenina 67. Redukcí sloučeniny 67 borohydridem sodným a následnou reakcí s anhydridem trifluormethansulfonové kyseliny se získá derivát triflátu, sloučenina 68. Reakcemi sloučeniny 68 s různými nukleofilními činidly se získá řada nových 1'-C-rozvětvených thymidinů, sloučeniny 69. Tak reakcí sloučeniny 68 s kyanidem, dusitanem nebo azidem sodným se získají odpovídající 1'-C-kyanmethyl-, 1'-C-nitromethyl- a 1'-C-azidomethylthymidiny. Reakcí sloučeniny 68 s nitromethanem se získá 1'-C-nitroethylthymidin. Reakcí sloučeniny 68 s alkylsulfidy sodnými se získá 1'-C-alkylthiomethylthymidin. Reakcí sloučeniny 68 s alkoxidem sodným se získá 1'-C-alkoxymethylthymidin. Reakcí sloučeniny 68 s lithiumorganokuprátovými reakčními činidly se získají 1'-C-alkyl- a 1'-C-alkenylthymidiny. Pro přípravu 1'-C-substituovaných alkyl- nebo 1'-C-substituovaných alkenylthymidinů lze použít substituovaná alkyl- nebo alkenylzinková nebo kadmiová činidla. Jako substituenty lze uvést COOEt, CN, NO₂. Hydroborací nebo oxidačním štěpením vzniklých 3'-C-(ω -alkenyl)thymidinů se získají hydroxyalkylthymidiny, jejichž hydroxylovou skupinu lze převést na různé funkční skupiny, jako jsou NH₂, OR, SR, SH a X, kde R je atom vodíku nebo alkylová skupina a X je atom fluoru, chloru, bromu, jodu nebo skupina OTs. Pro přípravu 1'-C-alkoxymethylthymidinů a 1'-C-fenoxymethylthymidinů lze použít substituované alkoholy a fenoly. Jako substituenty lze uvést NO₂, CN, COOEt nebo OAc. 1'-C-nitroalkylthymidiny lze redukovat na odpovídající aminoalkylthymidiny. Sloučeniny 69 se nechají reagovat s TBAF, čímž se získají sloučeniny 70 s odstraněnými chránicími skupinami, které se převedou na odpovídající fosforamidity, sloučeniny 71.

Sloučenina 63 se úplně chrání *p*-methoxybenzylovou skupinou (MPM) a získá se sloučenina 72. Hydrolýzou sloučeniny 72 v přítomnosti peroxidu vodíku a báze se získá sloučenina 73, která se podrobí Hofmannovu přesmyku a získá se amin, který může být reakcí s methylbromidem převeden na kvartérní amoniový derivát, sloučeninu 74. K náhradě trimethylaminu lze použít různá nukleofilní činidla. Reakcí sloučeniny 74 s alkoxidem sodným se získají 1'-C-alkoxythymidiny. Reakcí sloučeniny 74 s alkylsulfidem sodným se získají 1'-C-alkylthiothymidiny. Zahříváním s bromidem sodným lze sloučeninu 74 převést na 1'-C-bromthymidin, který se nechá reagovat s azidem sodným, dusitanem sodným nebo s nitromethanem a získají se odpovídající 1'-C-substituované thymidiny. Sloučeniny 75 se nechají reagovat s ceriumamoniumnitratem a získají se sloučeniny 76 s odstraněnými chránicími skupinami. 5'-hydroxylová skupina se chrání dimethoxytritylovou skupinou a vzniklé produkty, sloučeniny 77, se převedou na odpovídající fosforamidity, sloučeniny 78.

Oligonukleotidy obsahující nukleosidy s modifikovanou cukernou částí molekuly

Oligonukleotidy obsahující nukleosidy s modifikovanou cukernou částí molekuly byly již dříve popsány (A) P. N. Jorgensen, P. C. Stein, J. Wengel, J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 2231, B) J. Fensholdt, H. Thrane, J. Wengel, Tetrahedron Letts., 1995, 36, 2535, C) H. Thrane, J. Fensholdt, M. Regner, J. Wengel, Tetrahedron, 1995, 51, 10 389, D) A. K. Saha, T. J. Caulfield, C. Hobbs, D. A. Upson, C. Waychunas, A. M. Yawman, J. Org. Chem., 1995, 60, 788, E) A. Azhaye, A. Gouzaev, J. Hovinen, E. Azhaye, H. Lonnberg, Tetrahedron Lett., 1993, 34, 6435 až 6438, F) A. Ono, A. Dan, A. Matsuda, Bioconjugate Chemistry, 1993, 4, 499 až 508, G) H. Inoue, Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, K. Miuta, E. Ohtsuka, Nucleic Acids Res., 1987, 15, 6131, H) E. A. Lesnik, C. J. Guinasso, A. M. Kawasaki, H. Sasmor, M. Zounes, L. L. Cummins, D. J. Ecker, P. D. Cook, S. M. Freier, Biochemistry, 1993, 32, 7832). Předložený vynález popisuje velké množství nových nukleosidů s modifikovanou cukernou částí molekuly, které lze snadno zabudovat do oligonukleotidů za použití fosforamiditové chemie. Tyto oligonukleotidy s modifikovanou cukernou částí molekuly obsahují alespoň jeden nukleosid s modifikovanou cukernou částí podle vynálezu, mohou obsahovat v sekvenci více nukleosidů s modifikovanou cukernou částí nebo mohou obsahovat pouze nukleosidy s modifikovanou cukernou částí podle vynálezu. Tyto oligonukleotidy s modifikovanou cukernou částí mohou také obsahovat jiné

modifikované části, jako jsou modifikovaný skelet, modifikovaná báze a jakékoliv další modifikované cukry. Je samozřejmé, že rozvětvené substituenty v polohách C3' nebo C5' nukleosidů mohou snižovat rychlost reakce, a to v závislosti na velikosti těchto substituentů. Proto je pro některé objemné substituenty rozvětvených nukleosidů třeba zvýšit reakční dobu. Tak pro přípravu 5'-C-rozvětvených oligonukleotidů a 4'-C-rozvětvených oligonukleotidů je reakční doba 2 až 5 minut. Pro přípravu 3'-C-rozvětvených oligonukleotidů je reakční doba až 45 minut (3 x 15 minut). Pouze pro přípravu 3'-C-rozvětvených oligonukleotidů je třeba opakovat reakci s čerstvými reakčními složkami, protože 3'-hydroxylová skupina je terciární. Složení čistěných oligonukleotidů s modifikovanou cukernou částí molekuly se ověřuje analýzou produktů enzymového štěpení.

Předložený vynález je blíže objasněn v následujících příkladech, které však vynález pouze blíže ilustrují, ale neomezují jej.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-p-tosyloxymethylthymidinu

Roztok 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-hydroxymethylthymidinu (2,12 g, 3,69 mmol), připraveného podle známého postupu (P. N. Jorgensen, H. Thrane, J. Wengel, J. Am. Chem. Soc, 1994, 116, 2231), p-toluensulfonylchloridu (1,76 g, 9,23 mmol), DMAP (0,180 g, 1,48 mmol) v bezvodém pyridinu (13 ml) se míchá přes noc při teplotě místnosti. Reakční směs se ochladí na 0 °C, zředí se EtOAc (500 ml), promyje se 10% NaHCO₃, vysuší se Na₂SO₄ a zahustí se. Surová látka se čistí chromatografií na silikagelu (5 % CH₃OH v CH₂Cl₂) a získá se 2,39 g (89 %) 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-p-tosyloxymethylthymidinu ve formě bezbarvého prášku.

Příklad 2

Příprava 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-kyanmethylthymidinu

Suspenze 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-p-toluensulfonyloxymethylthymidinu (0,50 g, 0,686 mmol) a kyanidu draselného (0,134 g, 2,06 mmol) v bezvodém DMF (7 ml) se míchá přes noc při teplotě místnosti. Reakční směs se zředí EtOAc (60 ml) a promyje se vodou (3 x 75 ml), potom 10% NaHCO₃ (3 x 75 ml). Organická vrstva se vysuší Na₂SO₄, zahustí a čistí se chromatografií na silikagelu (EtOAc-hexany, 1:1) a získá se 0,386 g (97 %) 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-kyanmethylthymidinu ve formě bezbarvého prášku.

Příklad 3

Příprava 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-azidomethylthymidinu

Suspenze 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-p-toluensulfonyloxymethylthymidinu (0,40 g, 0,55 mmol) a NaN₃ (0,11 g, 1,65 mmol) v bezvodém DMF (3 ml) se zahřívá na teplotu 50 °C po dobu 3 dnů. Reakční směs se ochladí na teplotu místnosti, zředí se EtOAc (30 ml) a promyje se vodou (3 x 40 ml) a potom 10% NaHCO₃ (3 x 40 ml). Organická vrstva se vysuší Na₂SO₄, zahustí se a čistí se chromatografií na silikagelu (EtOAc-hexany, 1:1) a získá se 0,30 g (92 %) 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-azidomethylthymidinu ve formě bezbarvého prášku.

Příklad 4

5 Příprava 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-kyanmethylthymidinu

10 K míchanému roztoku 5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-kyanmethylthymidinu (0,20 g, 0,344 mmol) a diizopropylethylaminu (0,24 ml, 1,38 mmol) v bezvodém dichlormethanu (3 ml) se při 0 °C v atmosféře argonu přidá po kapkách roztok 2'-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamiditu (170 mg, 0,715 mmol) v dichlormethanu. Vzniklá reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 2 hodin, načež se ochladí na 0 °C, zředí se studeným CH₂Cl₂ (20 ml) a promyje se studeným NaHCO₃ (3 x 15 ml). Organická vrstva se vysuší Na₂SO₄ a zahustí. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (Et₃N-EtOAc-CH₂Cl₂, 5:50:45) a získá se 177 mg (66 %) 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-kyanmethylthymidinu ve formě pěny.

Příklad 5

20 Příprava 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-azidomethylthymidinu

25 K míchanému roztoku 5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-azidomethylthymidinu (252 mg, 0,344 mmol) a diizopropylethylaminu (0,44 ml, 2,51 mmol) v bezvodém dichlormethanu (3 ml) se v atmosféře argonu při teplotě 0 °C přidá po kapkách roztok 2'-kyanethyl-*N,N*-diizopropylchlorfosforamiditu (296 mg, 1,25 mmol) v dichlormethanu. Vzniklá reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 2 hodin, ochladí se na 0 °C, zředí se studeným CH₂Cl₂ (20 ml) a promyje se studeným NaHCO₃ (3 x 15 ml). Organická vrstva se vysuší Na₂SO₄ a zahustí se. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (Et₃N-EtOAc-CH₂Cl₂, 5:50:45) a získá se 128 mg (38 %) 3'-(2-azidomethyl-*N,N*-diizopropylfosforamido)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-azidomethylthymidinu ve formě pěny.

Příklad 6

35 Příprava 5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C,*O*-methylenthymidinu

40 K suspenzi NaH (60% v minerálním oleji, 0,18 g, 7,5 mmol) v bezvodém THF (18 ml) se v atmosféře argonu při teplotě 0 °C přidá po kapkách roztok 5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-*p*-toluensulfonyloxymethylthymidinu (1,5 g, 2,06 mmol) v THF (10 ml). Vzniklá reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 2 hodin, ochladí se na 0 °C a reakce se ukončí přidáním vody. Směs se zředí EtOAc (250 ml), promyje se vodou (2 x 200 ml), potom 10% NaHCO₃ (2 x 200 ml), vysuší se Na₂SO₄ a zahustí se. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (5 % CH₃OH v CH₂Cl₂) a získá se 0,97 g (85 %) 5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C,*O*-methylenthymidinu ve formě pěny.

Příklad 7

50 Příprava 5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-methylthymidinu

K míchané suspenzi lithiualuminiumhydridu (58 mg, 1,53 mmol) v bezvodém THF (10 ml) se v atmosféře argonu při teplotě 0 °C přidá po kapkách roztok 5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C,*O*-methylenthymidinu (385 mg, 0,692 mmol) v THF (10 ml). Reakční směs se míchá při

teplotě 0 °C po dobu 1 hodiny a reakce se ukončí pomalým přidáním 10% NaHCO₃. Vzniklá směs se zředí EtOAc (30 ml), promyje se NaHCO₃ (3 x 20 ml), vysuší se Na₂SO₄ a zahustí. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (5 % CH₃OH v CHCl₃) a získá se 306 mg (79 %) 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-methylthymidinu ve formě pěny.

5

Příklad 8

Příprava 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-methylthymidinu

10

K míchanému roztoku 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-methylthymidinu (98 mg, 0,17 mmol) a diizopropylethylaminu (0,13 ml, 0,742 mmol) v bezvodém dichlormethanu (2 ml) se v atmosféře argonu při teplotě 0 °C přidá po kapkách roztok 2'-kyanethyl-*N,N*-diizopropylchlorfosforamiditu (85 mg, 0,36 mmol) v dichlormethanu. Vzniklá reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny, pak se ochladí na 0 °C, zředí se studeným CH₂Cl₂ (20 ml) a promyje se studeným NaHCO₃ (3 x 15 ml). Organická vrstva se vysuší Na₂SO₄ a zahustí. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (Et₃N-EtOAc-hexan, 5:50:45) a získá se 117 mg (88 %) 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-methylthymidinu ve formě pěny.

15

20

Příklad 9

Příprava 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-aminomethylthymidinu

25

K roztoku 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-*O*-methylethylthymidinu (901 mg, 1,62 mmol) v methanolu (3 ml) se přidá nasycený roztok amoniaku v methanolu (9 ml) a vzniklý roztok se nechá stát při teplotě místnosti po dobu 3 dnů. Nadbytek amoniaku a methanolu se odpaří a zbytek se čistí chromatografií (CH₃OH-hexan-CHCl₃, 1:1:8) a získá se 414 mg (45 %) 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-aminomethylthymidinu ve formě bezbarvé pevné látky.

30

Příklad 10

35

Příprava 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu

Roztok 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-aminomethylthymidinu (361 mg, 0,628 mmol) a ethylthiotrifluoracetátu (490 mg, 3,12 mmol) v bezvodém THF (6 ml) se míchá při teplotě místnosti po dobu 6 hodin. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (5 % CH₃OH v CH₂Cl₂) a získá se 411 mg (98 %) 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu ve formě bezbarvého prášku.

40

Příklad 11

45

Příprava 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu

K míchanému roztoku 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-methylthymidinu (411 mg, 0,614 mmol) a diizopropylethylaminu (0,64 ml, 3,65 mmol) v bezvodém dichlormethanu (6 ml) se v atmosféře argonu při teplotě 0 °C přidá po kapkách roztok 2'-kyanethyl-*N,N*-diizopropylchlorfosforamiditu (410 mg, 1,83 mmol) v bezvodém dichlormethanu. Vzniklá reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 2 hodin, načež se ochladí na 0 °C, zředí se studeným CH₂Cl₂

50

(30 ml) a promyje se studeným NaHCO_3 (3 x 20 ml). Organická vrstva se vysuší Na_2SO_4 a zahustí. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (Et_3N - EtOAc - CHCl_3 , 5:30:65) a získá se 386 mg (72 %) 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu ve formě prášku.

5

Příklad 12

Příprava 3'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-formylthymidinu

10

K míchanému studenému roztoku 3'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)thymidinu (připravenému z thymidinu obvyklým postupem, 40,4 g, 0,072 mol) v bezvodém DMSO se přidá roztok DCC (45,86 g, 0,224 mol) v DMSO (180 ml). Vzniklý roztok se míchá při teplotě 5 °C po dobu 5 minut, načež se přidá pyridin (2,94 g, 3,0 ml, 0,0371 mol) a po dalším míchání po dobu 5 minut se přidává po 15 kapkách roztok trifluoroctové kyseliny (2,11 g, 1,43 ml, 0,0185 mol) v DMSO (2 ml). Vzniklá reakční směs se míchá při teplotě 5 °C po dobu 10 minut a potom při teplotě místnosti po dobu 6 hodin. Pak se za chlazení přidává po kapkách voda (20 ml) a směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny. Sraženiny se odfiltrují a promyjí DMSO. Spojené DMSO roztoky se 20 nalejí za míchání na drcený led (4 l). Po jednohodinovém stání se sraženiny odfiltrují a promyjí pečlivě vodou. Filtrační koláč se rozpustí v methylenchloridu (500 ml) a organická vrstva se oddělí, vysuší (Na_2SO_4) a zahustí. Surový produkt se čistí chromatografií na silikagelu (3 % methanolu v methylenchloridu) a získá se 32,6 g (81 %) 3'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-formylthymidinu ve formě bezbarvého prášku.

25

Příklad 13

Příprava 3'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-hydroxymethylthymidinu

K míchanému roztoku 3'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-formylthymidinu (16,3 g, 30,07 mmol) v dioxanu (120 ml) se při teplotě 0 °C přidá po kapkách postupně 36% formaldehyd (24 ml) a 2N NaOH (60 ml). Vzniklý roztok se míchá při teplotě místnosti po dobu 6 hodin. Reakční směs se ochladí na 0 °C a po kapkách se přidává 10% kyselina octová ve vodě, až hodnota pH dosáhne 7,5. Směs se zředí ethylacetátem (1 l), promyje se 10% roztokem chloridu sodného 35 (500 ml, potom 2 x 300 ml), vysuší se (Na_2SO_4) a zahustí. Surový produkt se čistí chromatografií na silikagelu (EtOAc -hexan, 3:1) a získá se 11,45 g (66,3 %) 3'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-hydroxymethylthymidinu ve formě bezbarvého prášku.

Příklad 14

Příprava 4'-C-hydroxymethylthymidinu

Roztok 3'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-hydroxymethylthymidinu (6,32 g, 11,0 mmol) 45 v 80% kyselině octové ve vodě (50 ml) se nechá stát při teplotě místnosti po dobu 4 hodin. Rozpouštědla se odstraní za sníženého tlaku a přidá se voda (200 ml). Vzniklá zakalená směs se promyje etherem (3 x 80 ml) a voda se odpaří. Zbytek se rozpustí v methanolu a toluenu a vzniklý roztok se zahustí. Tento postup se opakuje dvakrát. Získá se 4'-C-hydroxymethylthymidin (2,72 g, 91 %) ve formě pěny.

50

Příklad 15

Příprava 4'-C-benzoyloxymethylthymidinu

5

K míchanému roztoku 4'-C-hydroxymethylthymidinu (3,72 g, 13,67 mmol) v bezvodém pyridinu (10 ml) se při teplotě 0 °C přidá roztok anhydridu kyseliny benzoové (4,64 g, 51 mmol) v pyridinu (10 ml). Vzniklý roztok se nechá stát při teplotě 0 °C po dobu 1 hodiny a potom při teplotě místnosti po dobu 20 hodin. Při teplotě 0 °C se přidá voda (5 ml), pyridin se odpaří a zbytek se chromatografuje na silikagelu (7 % ethanolu v chloroformu) a získá se 2,27 g (44 %) 4'-C-benzoyloxymethylthymidinu ve formě bezbarvé pevné látky.

10

Příklad 16

15

Příprava 3',5'-O-(bis-tetrahydropyranyl)-4'-C-hydroxymethylthymidinu

K míchanému roztoku 4'-C-benzoyloxymethylthymidinu (1,65 g, 4,39 mmol) a *p*-toluen-sulfonové kyseliny (50 mg) v bezvodém methylenchloridu (70 ml) se při teplotě 0 °C přidá po kapkách dihydropyran (1,84 g, 1,89 ml, 21,80 mmol). Vzniklý roztok se míchá při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Pak se za chlazení přidá 2N NaOH (20 ml), vzniklá směs se zahustí, čímž se odstraní methylenchlorid, a přidá se dioxan (10 ml). Směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 3 hodin a extrahuje se methylenchloridem (3 x 30 ml). Organická vrstva se promyje vodou (3 x 50 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahustí. Zbytek se čistí filtrací přes kolonu silikagelu a získá se 1,50 g (77,7 %) 3',5'-O-(bis-tetrahydropyranyl)-4'-C-hydroxymethylthymidinu ve formě pěny.

20

25

Příklad 17

30

Příprava 4'-C-methoxymethylthymidinu

K míchané směsi 3',5'-O-(bis-tetrahydropyranyl)-4'-C-hydroxymethylthymidinu (660 mg, 1,5 mmol) a hydridu sodného (60% v minerálním oleji, 180 mg, 4,5 mmol) v bezvodém THF (15 ml) se při teplotě 0 °C přidá po kapkách methyljodid (1,06 g, 0,46 ml). Vzniklá směs se míchá při teplotě 0 °C po dobu 1,5 hodiny. Při 0 °C se po kapkách přidá voda (1 ml) a kyselina octová, čímž se pH upraví na 7. Směs se zředí ethylacetátem (50 ml), promyje se vodou (3 x 30 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahustí. Zbytek se rozpustí v kyselé směsi (5 ml THF, 10 ml CH₃COOH a 5 ml vody), roztok se nechá stát při teplotě 50 °C po dobu 3 hodin a rozpouštědla se odpaří. Zbytek se rozpustí ve směsi methanolu a toluenu, zahustí se a postup se ještě jednou opakuje. Čištěním chromatografií na silikagelu (10% methanol v chloroformu) se získá 271 mg (63 %) 4'-C-methoxymethylthymidinu ve formě bezbarvé pevné látky.

35

40

Příklad 18

45

Příprava 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-methoxymethylthymidinu

Roztok 4'-C-methoxymethylthymidinu (173 mg, 0,6 mmol) a dimethoxytritylchloridu (287 mg, 0,84 mmol) v pyridinu se nechá stát při teplotě místnosti po dobu 5 hodin. Pyridin se odpaří a zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (EtOAc-hexan, 2:1) a získá se 264 mg (74 %) 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-methoxymethylthymidinu ve formě pěny.

50

Příklad 19

Příprava 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-methoxymethylthymidinu

K míchanému roztoku 5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-methoxymethylthymidinu (200 mg, 0,34 mmol) a diizopropylethylaminu (176 mg, 236 μ l, 1,36 mmol) v bezvodém methylenchloridu (3 ml) se v atmosféře dusíku při teplotě 0 °C přidá po kapkách roztok 2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylchlorfosforamiditu (161 mg, 152 μ l, 0,68 mmol) v methylenchloridu (1 ml). Vzniklý roztok se míchá při teplotě místnosti po dobu 30 minut, načež se ochladí na 0 °C a zředí se ethylacetátem (30 ml). Směs se promyje 10% NaHCO₃ (3 x 20 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahustí. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (Et₃N-EtOAc-hexan, 5:45:50) a získá se 190 mg (71 %) 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-methoxymethylthymidinu ve formě pěny.

Příklad 20

Příprava 3',5'-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-hydroxymethylthymidinu

Ke studenému míchanému roztoku 4'-C-benzoylmethylthymidinu (1,14 g, 3,03 mmol) a imidazolu (985 mg, 15,15 mmol) v pyridinu se přidá roztok *terc*-butyldimethylchlorsilanu (1,37 g, 9,09 mmol) v pyridinu. Reakční směs se nechá stát při teplotě 50 °C přes noc, zředí se ethylacetátem (100 ml), promyje se vodou (3 x 50 ml) a zahustí. Zbytek se rozpustí v ethanolu (10 ml) a přidá se směs ethylendiaminu a ethanolu (1:1, 20 ml). Roztok se zahřívá na teplotu 50 °C po dobu 2 dnů. Ethanol a ethylendiamin se odpaří za sníženého tlaku a zbytek se rozpustí v chloroformu (60 ml). Roztok se promyje vodou (3 x 40 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahustí. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (EtOAc-hexan, 1:1) a získá se 780 mg (52 %) 3',5'-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-hydroxymethylthymidinu ve formě bílé pevné látky.

Příklad 21

Příprava 3',5'-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-aminomethylthymidinu

K míchanému roztoku 3',5'-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-hydroxymethylthymidinu (500 mg, 1,0 mmol) a pyridinu (0,4 ml) v bezvodém methylenchloridu (5 ml) se při teplotě 0 °C po kapkách přidá směs anhydridu trifluormethansulfonové kyseliny (564 mg, 332 μ l, 2,0 mmol) a pyridinu (0,4 ml) v methylenchloridu (5 ml). Reakční směs se míchá při teplotě 0 °C po dobu 30 minut a pak se při teplotě -10 °C přidá 0,5 ml 10% NaHCO₃. Směs se zředí methylenchloridem (20 ml), promyje se studeným 10% NaHCO₃ (2 x 30 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahustí a suší se za sníženého tlaku po dobu 1 hodiny. Surový produkt se rozpustí v dioxanu (30 ml) a nasytí se plynným amoniakem. Roztok se nechá stát při teplotě místnosti přes noc a potom se zahřívá na 50 °C po dobu 2 dnů. Nadbytek amoniaku a dioxanu se odpaří a zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (1 % MeOH a 5 % Et₃N v CHCl₃) a získá se 266 mg (53 %) 3',5'-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-aminomethylthymidinu ve formě bílé pevné látky.

Příklad 22

Příprava 3',5'-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu

Roztok 3',5'-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-aminomethylthymidinu (260 mg, 0,52 mmol) a ethylthiotrifluoracetátu (635 mg, 0,52 ml, 4,0 mmol) v dioxanu se míchá při teplotě místnosti

po dobu 5 hodin. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (5 % methanolu v chloroformu) a získá se 220 mg (71 %) 3',5'-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu ve formě bílé pevné látky.

5

Příklad 23

Příprava 4'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu

10 Roztok 3',5'-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu (215 mg, 0,36 mmol) a TBAF (1,0 M v THF, zneutralizovaný kyselinou octovou na pH 7,5, 0,72 ml) v THF (3 ml) se nechá stát při teplotě místnosti po dobu 20 hodin. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (10 % methanolu v chloroformu) a získá se 118 mg (89 %) 4'-trifluoracetamidomethylthymidinu ve formě bílé pevné látky.

15

Příklad 24

Příprava 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu

20

Roztok 4'-trifluoracetamidomethylthymidinu (110 mg, 0,3 mmol) a dimethoxytritylchloridu (152 mg, 0,45 mmol) v bezvodém pyridinu (2 ml) se nechá stát při teplotě místnosti přes noc. Pyridin se odpaří a zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (EtOAc-hexan, 2:1) a získá se 122 mg (61 %) 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu ve formě pěny.

25

Příklad 25

30 Příprava 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu

K míchanému roztoku 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu (110 mg, 0,165 mmol) a diizopropylethylaminu (129 mg, 174 μ l, 1,0 mmol) v bezvodém methylenchloridu (3 ml) se v atmosféře dusíku při teplotě 0 °C přidá po kapkách roztok 2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylchlorfosforamiditu (78 mg, 74 μ l, 0,33 mmol) v methylenchloridu (1 ml). Vzniklý roztok se míchá při teplotě místnosti po dobu 30 minut, načež se ochladí na 0 °C a zředí se ethylacetátem (20 ml). Směs se promyje 10% NaHCO₃ (3 x 15 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahustí. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (Et₃N-EtOAc-hexan, 5:45:50) a získá se 137 mg (86 %) 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-methoxymethylthymidinu ve formě pěny.

40

Příklad 26

45

Příprava 3',5'-O-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-azidomethylthymidinu

K míchanému roztoku 3',5'-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-hydroxymethylthymidinu (0,95 g, 0,19 mmol) a pyridinu (0,1 ml) v bezvodém methylenchloridu (1 ml) se při teplotě 0 °C přidá po kapkách směs anhydridu trifluormethansulfonové kyseliny (107 mg, 0,38 mmol, 63 μ l) a pyridinu (0,2 ml) v methylenchloridu (2,5 ml). Reakční směs se míchá při teplotě 0 °C po dobu 30 minut, ochladí se na -10 °C a přidá se 0,5 ml 10% NaHCO₃. Směs se zředí studeným methylenchloridem (10 ml), promyje se studeným 10% NaHCO₃ (2 x 10 ml), vysuší se (Na₂SO₄), zahustí a suší se za sníženého tlaku po dobu 10 minut. Surový produkt se rozpustí v bezvodém

50

DMF (1 ml) a přidá se azid sodný (50 mg). Směs se zahřívá na teplotu 50 °C po dobu 14 hodin, zředí se ethylacetátem (20 ml), promyje se vodou (5 x 10 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahustí. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (10 % ethylacetátu v methylenchloridu) a získá se 42 mg 3',5'-O-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-azidomethylthymidinu ve formě pěny.

Příklad 27

Příprava 4'-C-azidomethylthymidinu

Roztok 3',5'-O-(bis-*terc*-butyldimethylsilyl)-4'-C-azidomethylthymidinu (25 mg) a TBAF (1,0 M v THF, 0,5 ml) v THF (1 ml) se nechá stát při teplotě místnosti po dobu 30 minut. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se čistí Chromatografií na silikagelu (6 % MeOH v CH₂Cl₂) a získá se 11 mg 4'-C-azidomethylthymidinu ve formě bezbarvé pevné látky.

Příklad 28

Příprava 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-deoxy-5'-methylidenthymidinu

Suspenze hydridu sodného (60% v minerálním oleji, 2,88 g, 72 mmol) v bezvodém DMSO (100 ml) se míchá při teplotě 65 °C v atmosféře dusíku po dobu 1,5 hodiny, čímž vznikne čirý roztok, který se ochladí na teplotu místnosti a převede se v atmosféře dusíku do studené míchané suspenze methyltrifenylfosfoniumbromidu (27,0 g, 75,6 mmol) v DMSO (20 ml). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 45 minut a za chlazení se přidá roztok 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-formylthymidinu (8,50 g, 24 mmol) v DMSO (40 ml). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 2 hodin, zředí se ethylacetátem (2 l), promyje se roztokem chloridu sodného (5 x 800 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahustí. Surový produkt se čistí chromatografií na silikagelu (EtOAc-hexan, 30:70) a získá se 6,79 g (80,2 %) 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-deoxy-5'-methylidenthymidinu ve formě bezbarvé pevné látky, teploty tání 122 °C (rekrytalizace z ethylacetátu a hexanu).

Příklad 29

Příprava 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-C,O-methylenthymidinu

Roztok 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-deoxy-C,O-methylidenthymidinu (6,26 g, 17,78 mmol) a m-chlorperoxybenzoové kyseliny (4,61 g, 26,68 mmol) v methylenchloridu (160 ml) se míchá při teplotě místnosti přes noc, pak se zředí methylenchloridem (200 ml), promyje se roztokem chloridu sodného (160 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahustí. Zbytek se chromatografuje na silikagelu (Na₂SO₄) a zahustí. Zbytek se chromatografuje na silikagelu (EtOAc-hexan, 1:2) a získá se nezreagovaná výchozí látka, (2,25 g, 35,9 %), 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(*S*)-C,O-methylenthymidin (3,2 g, 76 %) a 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(*R*)-C,O-methylenthymidin (0,365 g, 8 %).

Příklad 30

Příprava 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-C-methoxymethylthymidinu

Roztok 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(*R*)-C,O-methylenthymidinu (1,84 g, 5 mmol) a bezvodého uhlíčitanu draselného (1,38 g, 10 mmol) v methanolu se míchá při teplotě místnosti po dobu 90 hodin. Přidá se ethylacetát (70 ml) a směs se zneutralizuje kyselinou octovou na pH 7. Roz-

pouštědla se odpaří a zbytek se rozpustí v methylenchloridu (30 ml). Sraženiny se odfiltrují a roztok se zahustí. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (EtOAc–hexan, 1:1) a získá se 310 mg nezreagované výchozí látky a 578 mg 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-C-methoxymethylthymidinu ve formě bezbarvé pevné látky.

5

Příklad 31

Příprava 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu

10

Roztok 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(R)-C,O-methylthymidinu (0,84 g, 2,28 mmol) v methanolu se smíchá s roztokem amoniaku nasyceným methanolem (10 ml). Vzniklý roztok se nechá stát při teplotě místnosti po dobu 15 hodin a potom se nadbytek amoniaku a methanolu odpaří. Vysušený zbytek se rozpustí v dioxanu (10 ml) a přidá se ethylthiotrifluoracetát (1,80 g, 11,4 mmol, 1,46 ml). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 6 hodin a potom se rozpouštědlo odpaří. Zbytek se chromatografuje na silikagelu (EtOAc–hexan, 1:1) a získá se 895 mg (81,8 %) 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-C-trifluoracetamidomethylthymidinu ve formě bezbarvé pevné látky.

15

20

Příklad 32

Příprava 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(S)-C-kyanmethylthymidinu

25

Směs 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(R)-C,O-methylthymidinu (0,77 g, 2,09 mmol) a kyanidu draselného (520 mg, 8,0 mmol) v DMF (10 ml) se míchá při teplotě místnosti po dobu 40 hodin, načež se zředí ethylacetátem (100 ml), promyje roztokem chloridu sodného (5 x 60 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahustí. Surový produkt se čistí chromatografií na silikagelu (EtOAc–hexan, 1:1) a získá se 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(S)-C-kyanmethylthymidin (580 mg, 70 %) ve formě bílé pevné látky.

30

Příklad 33

35

Příprava 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(S)-C-azidomethylthymidinu

Směs 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(R)-C,O-methylthymidinu (368 mg, 1,0 mmol) a kyanidu draselného (325 mg, 5,0 mmol) v DMF (3 ml) se zahřívá na teplotu 50 °C po dobu 16 hodin, načež se zředí ethylacetátem (60 ml), promyje se roztokem chloridu sodného (5 x 40 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahustí. Surový produkt se čistí chromatografií na silikagelu (EtOAc–hexan, 1:1) a získá se 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(S)-C-kyanmethylthymidin (173 mg, 42 %) ve formě bílé pevné látky.

40

45

Příklad 34

Příprava 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-C-allylthymidinů

K suspenzi bezvodého kyanidu měďného (7,57 g, 84,7 mmol) v bezvodém THF se při teplotě -5 °C v atmosféře argonu přidá po kapkách allylmagneziumbromid (2,0 M v THF, 46,6 ml, 93,2 mmol). Suspenze se míchá při teplotě -5 °C po dobu 15 minut a pak se po kapkách přidá roztok 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-formylthymidinu (5,0 g, 14,12 mmol) v THF (200 ml). Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 6 hodin, načež se reakce ukončí přidáním 10% NaHCO₃ (150 ml) při teplotě 0 °C a zředí se ethylacetátem (200 ml). Organická vrstva se

50

promyje 10% NaHCO₃ (2 x 150 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahuštěním se získá 5,18 g surových 3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-*C*-allylthymidinů (obsahující dva 5'-(*R*) a 5'-(*S*) izomery). Tyto dva izomery (poměr asi 1:1) se rozdělí chromatografií na silikagelu s 15 % EtOAc v CHCl₃.

5

Příklad 35

Příprava 3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-methoxymethylthymidinů

10

Směs 3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-*C*-methoxymethylthymidinu (258 mg, 0,645 mmol), dimethoxytritylchloridu (1,09 g, 3,22 mmol) a stříbrné soli anhydridu trifluormethansulfonové kyseliny (835 mg, 3,22 mmol) v bezvodém pyridinu (3 ml) se zahřívá na teplotu 50 °C po dobu 18 hodin. Pyridin se odpaří a zbytek se chromatografuje na silikagelu (EtOAc-hexan, 1:1) a získá se 372 mg (82 %) 3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-methoxymethylthymidinu ve formě bílé pevné látky.

15

Podobně se připraví následující sloučeniny:

20

3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-kyanmethylthymidin se připraví z 3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(*S*)-*C*-kyanmethylthymidinu,

3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-azidomethylthymidin se připraví z 3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(*S*)-*C*-azidomethylthymidinu,

25

3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-allylthymidin se připraví z 3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(*S*)-*C*-allylthymidinu,

3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*R*)-*C*-allylthymidin se připraví z 3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(*R*)-*C*-allylthymidinu a

30

3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-trifluoracetamidomethylthymidin se připraví z 3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(*S*)-*C*-trifluoracetamidomethylthymidinu.

35

Příklad 36

Příprava 5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-methoxymethylthymidinů

40

Roztok 3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-methoxymethylthymidinu (825 mg, 1,17 mmol) a TBAF (1,0 M v THF, 3,6 ml, 3,6 mmol) v THF (15 ml) se nechá stát při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. THF se odpaří a zbytek se chromatografuje na silikagelu (EtOAc-hexan, 3:2) a získá se 551 mg (80 %) 5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-methoxymethylthymidinů.

45

Podobně se připraví následující sloučeniny:

5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-kyanmethylthymidin se připraví z 3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-kyanmethylthymidinu,

50

5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-azidomethylthymidin se připraví z 3'-*O*-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(*S*)-*C*-azidomethylthymidinu,

5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-allylthymidin se připraví z 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-allylthymidinu,

- 5 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(R)-C-allylthymidin se připraví z 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(R)-C-allylthymidinu a

- 10 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-trifluoracetamidomethylthymidin se připraví z 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-trifluoracetamidomethylthymidinu.

Příklad 37

- 15 Příprava 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-methoxymethylthymidinů

- 20 K roztoku 3'-O-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-methoxymethylthymidinu (490 mg, 0,83 mmol), diizopropylethylaminu (646 mg, 0,87 ml, 5,0 mmol) v bezvodém dichlormethanu (5 ml) se v atmosféře dusíku při teplotě 0 °C přidá po kapkách roztok 2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylchlorfosforamidu (592 mg, 2,5 mmol, 588 µl) v dichlormethanu (1 ml). Roztok se míchá při teplotě místnosti po dobu 40 minut, načež se ochladí na 0 °C, zředí se dichlormethanem (60 ml), promyje se studeným 5% NaHCO₃ (3 x 40 ml), vysuší se (Na₂SO₄) a zahustí. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (Et₃N-EtOAc-hexan, 5:45:50) a získá se 584 mg (89 %) 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-methoxymethylthymidinů ve formě pěny.

Podobně se připraví následující sloučeniny:

- 30 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-kyanmethylthymidin se připraví z 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-kyanmethylthymidinu,

- 35 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-azidomethylthymidin se připraví z 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-azidomethylthymidinu,

3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-allylthymidin se připraví z 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-allylthymidinu,

- 40 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(R)-C-allylthymidin se připraví z 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(R)-C-allylthymidinu,

- 45 3'-(2-kyanethyl-*N,N*-diizopropylfosforamidit)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-trifluoracetamidomethylthymidin se připraví z 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5'-(S)-C-trifluoracetamidomethylthymidinu.

Příklad 38

- 50 Příprava 1'-kyan-3'-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-(4,4'-dimethoxytrityl)thymidinu

K míchanému roztoku *terc*-butyldimethylchlorsilanu (1,5 ekvivalentů) a imidazolu (3,0 ekvivalenty) v bezvodém pyridinu se při teplotě 0 °C přidá 1'-kyan-5'-(4,4'-dimethoxytrityl)thymidin v bezvodém pyridinu. Vzniklá reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti. Pyridin se

odpaří a zbytek se rozpustí v ethylacetátu a promyje se roztokem chloridu sodného. Surový produkt se přímo použije pro další reakci.

5 Příklad 39

Příprava 3'-*terc*-butyldimethylsilyl-5'-dimethoxytrityl-1'-formyl-5-methoxybenzylthymidinu

10 K míchanému roztoku lithiumtriethoxyaluminiumhydridu (2,0 mmol) v THF se v atmosféře dusíku při teplotě -20 °C přidá 3'-*terc*-butyldimethylsilyl-1'-kvan-5'-dimethoxytrityl-5-(*p*-methoxybenzyl)thymidin (1,0 mmol) v THF. Reakční směs se míchá při teplotě 5 až 10 °C po dobu 1 hodiny a reakce se ukončí přidáním vodného roztoku amoniumchloridu. Směs se extrahuje ethylacetátem a surový produkt se chromatografuje na silikagelu.

15

Příklad 40

Příprava 1'-amido-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidinu

20 K míchanému vodnému roztoku 30% peroxidu vodíku a uhličitanu sodného se při teplotě 0 °C přidá 1'-amido-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidin. Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 2 hodin, zředí se vodou, zneutralizuje se zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a extrahuje se dichlormethanem. Surový produkt se čistí chromatografií.

25

Příklad 41

Příprava 1'-amino-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidinu

30 Postup je podobný postupu popsanému v literatuře (A. S. Radhakrishna, M. E. Parham, R. M. Riggs a G. M. Loudon, J. Org. Chem., 1979, 44, 1746). K míchanému roztoku 1,1-bis(trifluoracetoxijodbenzenu (2,0 mmol) v THF se při teplotě 0 °C přidá 1'-kvan-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidin (1,0 mmol) v bezvodém THF. Reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 5 hodin, zředí se dichlormethanem, promyje se 5% uhličitanem sodným a roztokem chloridu sodného. Surový produkt se čistí chromatografií.

35

Příklad 42

40 Příprava trimethyl-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidin-1'-yl-amoniumbromidu

K míchanému roztoku methylbromidu (10 ekvivalentů) v THF se při teplotě 0 °C přidá 1'-amino-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidin. Reakční směs se míchá při teplotě 50 °C přes noc. Rozpouštědlo se odpaří a surový produkt se čistí rekrystalizací.

45

Příklad 43

Příprava 1'-brom-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidinu

50

Postup je podobný postupu popsanému v literatuře (L. W. Deady, O. L. Korytsky, Tetrahedron Lett., 1979, 451). Trimethyl-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidin-1'-yl-amoniumbromid se zahřívá za sníženého tlaku na teplotu 150 °C přes noc. Vzniklý produkt se použije přímo pro další reakci.

Příklad 44

Příprava 1'-ethoxy-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidinu

5

K míchanému roztoku ethoxidu sodného v ethanolu se při teplotě $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ přidá 1'-brom-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidin v ethanolu. Vzniklá reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny, načež se zneutralizuje zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Ethanol se odpaří a zbylá směs se extrahuje ethylacetátem. Surový produkt se čistí chromatografií a získá se směs α a β diastereoizomerů.

10

Podobně se připraví následující sloučeniny:

15

1'-(4-nitrobutoxy)-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidin z 1'-brom-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidinu a 4-nitrobutan-1-olu,

1'-ethylthio-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidin z 1'-brom-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidinu a thioethoxidu sodného.

20

Příklad 45

Příprava 1'-aminothymidinu

25

Suspenze 1'-amino-3',5',5-tris(methoxybenzyl)thymidinu a 10% paladia na uhlí v ethanolu se třepe v hydrogenační aparatuře v atmosféře vodíku za tlaku 345 kPa po dobu 24 hodin. Pevná látka se odfiltruje a filtrát se zahustí. Surový produkt se čistí rekrystalizací.

30

Příklad 46

Příprava oligonukleotidů s modifikovanou cukernou částí

35

Tento příklad popisuje použití sloučeniny 55 (obr. 8) pro syntézu neuspořádaného oligonukleotidu majícího sekvence:



40

V této sekvenci A, C, G a T znamenají nemodifikovaný deoxyribonukleosid a T* znamená 5'-C-aminomethylthymidin. Oligonukleotid se v tomto příkladu syntetizuje ABI 394 DNA syntetizátorem. Všechny nukleosidy se zabudovávají za použití fosforamiditové chemie. Zabudovávání dA, dC, dG a T se provádí za použití standardních činidel pro syntézu DNA a standardním postupem. Vzhledem k sterické zábraně rozvětveného substituentu v poloze C5' thymidinu se zabudovávání T* provádí za delšího reakčního času (5 minut). Po syntéze se zpracování připraveného oligonukleotidu provádí standardním postupem. Surový oligonukleotid se čistí na Beckmanově HPLC koloně s reverzní fází C18 za použití TEAA pufru (pH 7,0) a acetonu jako mobilní fáze. Získá se 62,4 optických jednotek (OD) vyčištěného oligonukleotidu.

45

Podobně se připraví následující neuspořádané oligonukleotidy s modifikovanou cukernou částí:

50

5'-C-rozvětvené oligonukleotidy s modifikovanou cukernou částí:

1. 5'-TTCCTGTCTGATGGCTTC-3'
2. 5'-XXCCTGTCTGATGGCTTC-3'
3. 5'-TTCCTGTCXGATGGCTTC-3'
4. 5'-TTCCTGTCXGATGGCTTC-3'
5. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTXXC-3'
6. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTXXC-3'
7. 5'-ATCTCXCCGCTXCCTTC-3'
8. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTYC-3'
9. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTYYC-3'
10. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTYYC-3'
11. 5'-AYCTCYCCGCTYCCTTYC-3'
12. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTZC-3'
13. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTZZC-3'
14. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTZTZC-3'
15. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTVVC-3'
16. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTVVC-3'
17. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTVTVVC-3'
18. 5'-ATCTCVCCGCVTCCTTTC-3'
19. 5'-AVCTCTCCGCTTCCTTTC-3'
20. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTWC-3'
21. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTWWC-3'
22. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTWTC-3'
23. 5'-ATCTCWCCGCTTCCTTTC-3'
24. 5'-AWCTCTCCGCTTCCTTTC-3'

5

X = 5'-(S)-C-methoxymethylthymidin,

Y = 5'-(S)-C-aminomethylthymidin,

Z = 5'-(S)-C-kyanmethylthymidin,

10 V = 5'-(S)-C-allylthymidin a

W = 5'-(R)-C-allylthymidin.

4'-C-rozvětvené oligonukleotidy s modifikovanou cukernou částí:

25. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTTC-3'
26. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTXC-3'
27. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTXXC-3'
28. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTXXC-3'
29. 5'-AXCTCTCCGCTTCCTTTC-3'
30. 5'-ATCTCXCCGCTXCCTTTC-3'
31. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTYC-3'
32. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTYXC-3'
33. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTYXC-3'
34. 5'-AYCTCTCCGCTTCCTYXC-3'
35. 5'-ATCTCYCCGCTYCCTTTC-3'

5

X = 4'-C-methoxymethylthymidin,

Y = 4'-C-aminomethylthymidin.

3'-rozvětvené oligonukleotidy s modifikovanou cukernou částí:

10

36. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTTC-3'
37. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTXC-3'
38. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTXXC-3'
39. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTXXC-3'
40. 5'-ATCTCTCCGCXTCCTTTC-3'
41. 5'-AXCTCTCCGCTTCCTTTC-3'
42. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTYC-3'
43. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTYYC-3'
44. 5'-ATCTCTCCGCYTCCTTTC-3'
45. 5'-AYCTCTCCGCTTCCTYXC-3'
46. 5'-ATCTCYCCGCTYCCTTTC-3'
47. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTZC-3'
48. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTZZC-3'
49. 5'-ATCTCTCCGCTTCCTTZC-3'

X = 3'-C-aminomethylthymidin,

15

Y = 3'-C-methylthymidin a

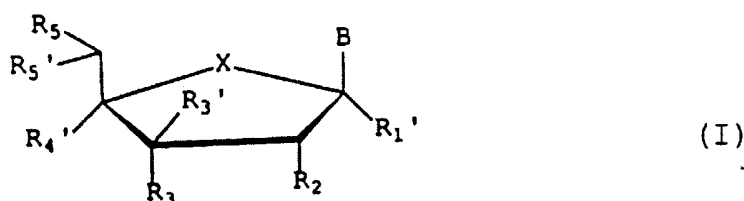
Z = 3'-C-kyanmethylthymidin.

Všechny zde citované patenty, patentové přihlášky a publikace jsou míněny jako odkazy.

Předpokládá se, že předchozí část popisu je dostatečná k tomu, aby mohl zkušený odborník provádět tento vynález. Je samozřejmé, že odborníci pracující v tomto oboru mohou provádět různé modifikace tohoto vynálezu, aniž by se odchýlil od rozsahu následujících nároků.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Nukleosid obecného vzorce I



ve kterém

R_2 znamená atom vodíku nebo hydroxyskupinu,

R_3 a R_5 znamenají nezávisle jeden na druhém hydroxyskupinu, *O*-2-kyanoethyl-(*N,N'*-diizopropyl)fosforamido-skupinu nebo hydroxyskupinu nesoucí ochrannou skupinu,

X znamená atom síry nebo skupinu NH ,

B znamená zbytek heterocyklické báze zvolené z množiny zahrnující adenin, guanin, xanthin, cytosin, uracil a thymín,

R_1' , R_3' , R_4' a R_5' znamenají nezávisle jeden na druhém atom vodíku, alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu s výhradou spočívající v tom, že všechny obecné substituenty R_1' , R_3' , R_4' a R_5' současně neznamenají atom vodíku,

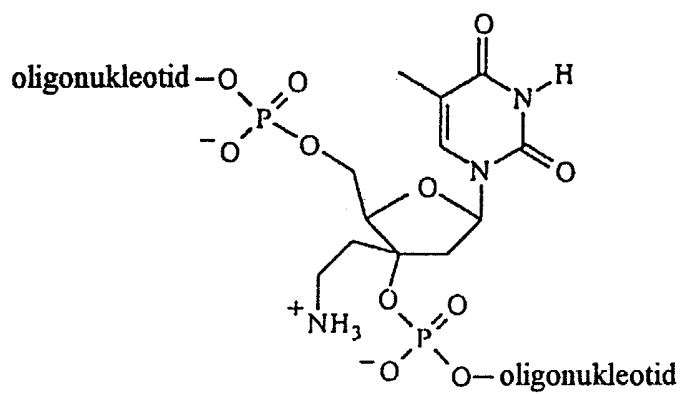
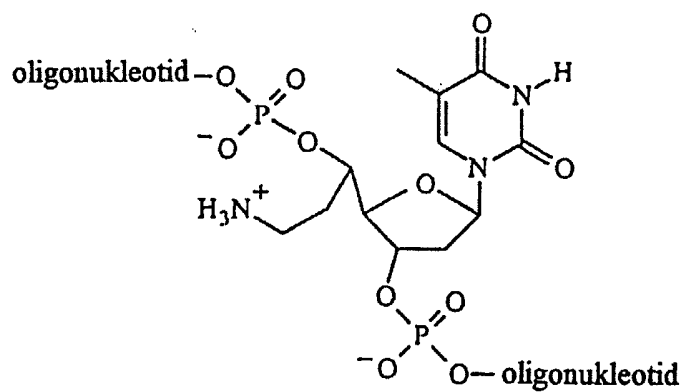
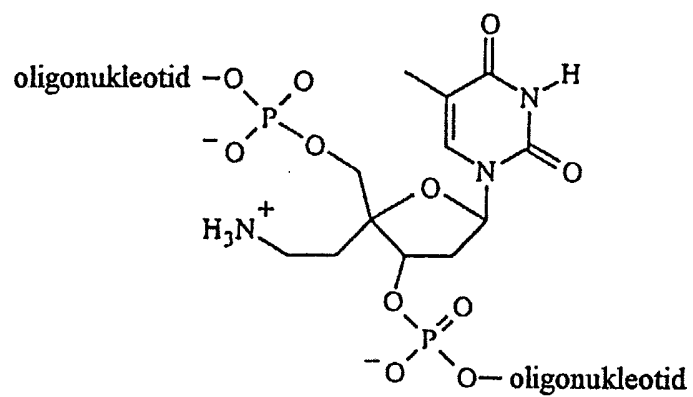
přičemž

každá alkylová skupina ve významu obecných substituentů R_1' , R_3' , R_4' a R_5' je přímou nebo rozvětvenou, nasycenou nebo nenasycenou alkylovou skupinou obsahující 1 až 10 uhlíkových atomů,

substituentová část substituované alkylové skupiny, substituované aralkylové skupiny a substituované arylové skupiny je zvolena z množiny zahrnující CN , NO_2 , N_3 , CF_3 , NH_2 , NR_2 , OH , OR , SH , $COOH$, $COOR$, SO_3R , F , Cl , Br a I , kde R znamená atom vodíku, alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, arylovou skupinu, acetylovou skupinu, trifluoracetylovou skupinu a tosylovou skupinu, a

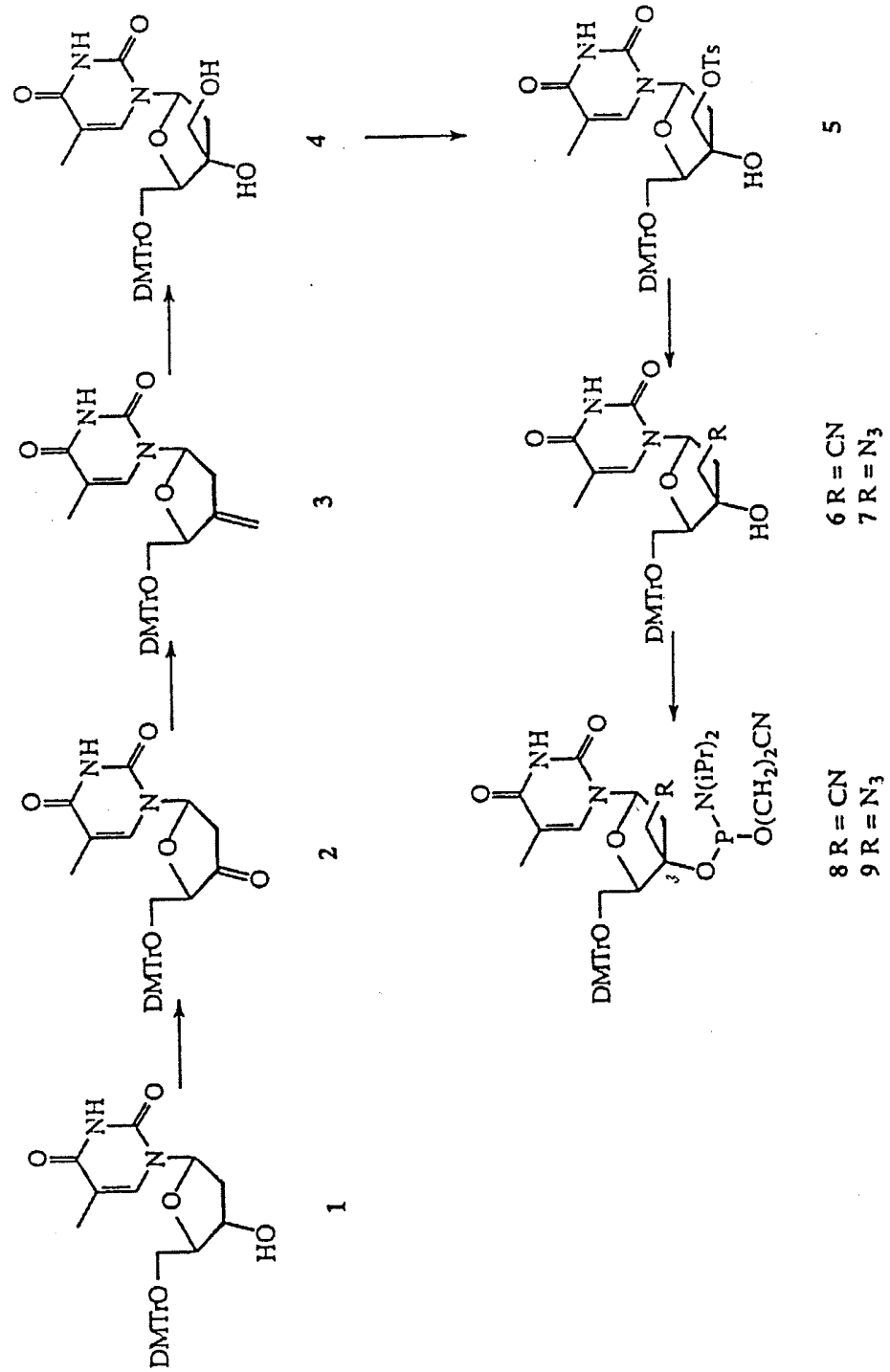
arylová skupina ve významu obecných substituentů R_1' , R_3' , R_4' a R_5' znamená fenylovou skupinu nebo heterocyklickou skupinu obsahující 3 nebo 4 atomy, kde heteroatomem je atom kyslíku.

2. Nukleosid podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém R_1' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_3' a R_4' a R_5' znamenají atom vodíku.
- 5 3. Nukleosid podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém R_3' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_1' , R_4' a R_5' znamenají atom vodíku.
- 10 4. Nukleosid podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém R_4' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_1' , R_3' a R_5' znamenají atom vodíku.
- 15 5. Nukleosid podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém R_5' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_1' , R_3' a R_4' znamenají atom vodíku.
- 20 6. Oligonukleotid obsahující nukleosid podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém R_1' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_3' a R_4' a R_5' znamenají atom vodíku.
- 25 7. Oligonukleotid obsahující nukleosid podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém R_3' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_1' , R_4' a R_5' znamenají atom vodíku.
- 30 8. Oligonukleotid obsahující nukleosid podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém R_4' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_1' , R_3' a R_5' znamenají atom vodíku.
- 35 9. Oligonukleotid obsahující nukleosid podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém R_5' znamená alkylovou skupinu, substituovanou alkylovou skupinu, aralkylovou skupinu, substituovanou aralkylovou skupinu, arylovou skupinu nebo substituovanou arylovou skupinu a R_1' , R_3' a R_4' znamenají atom vodíku.

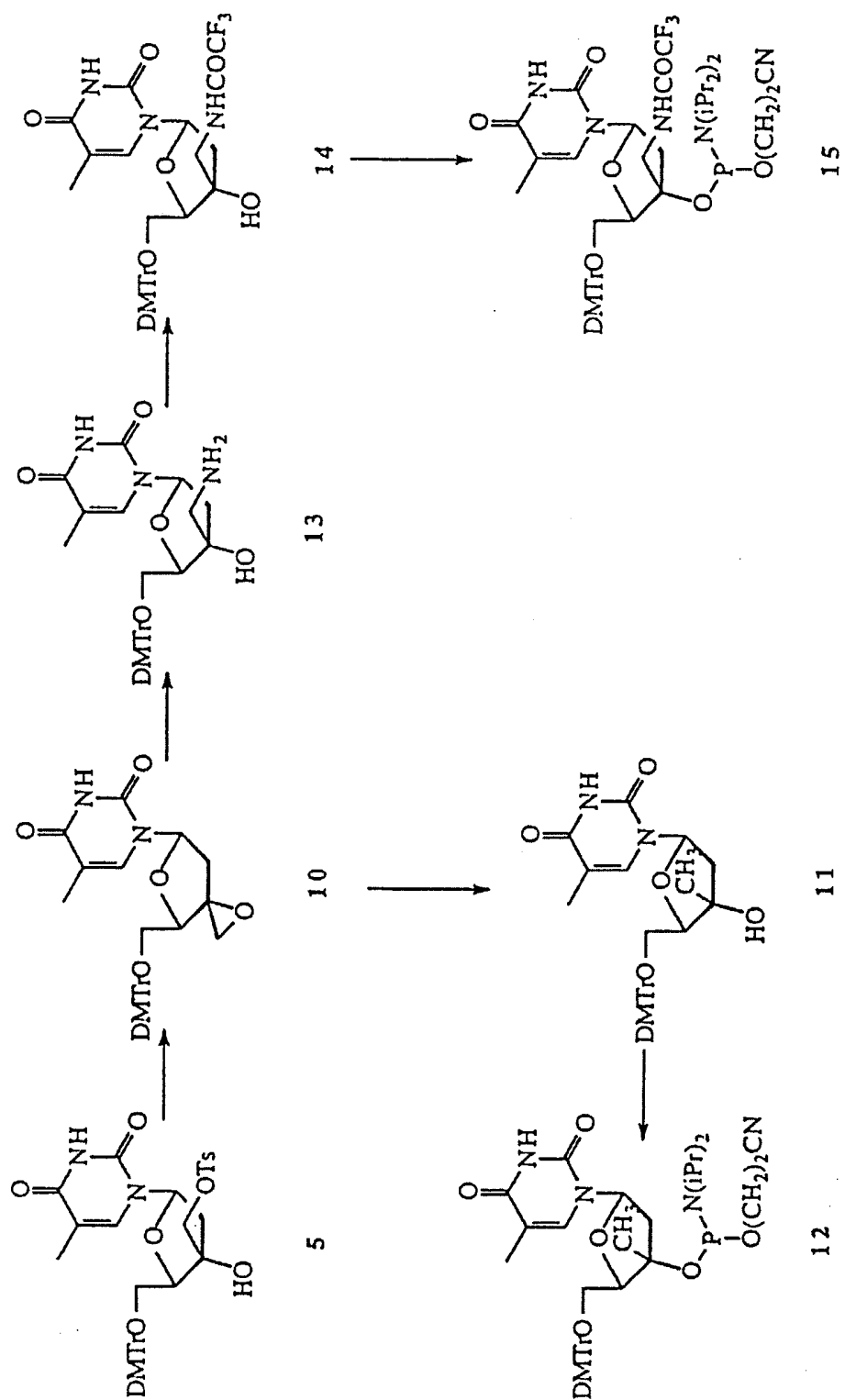


OBR. 1

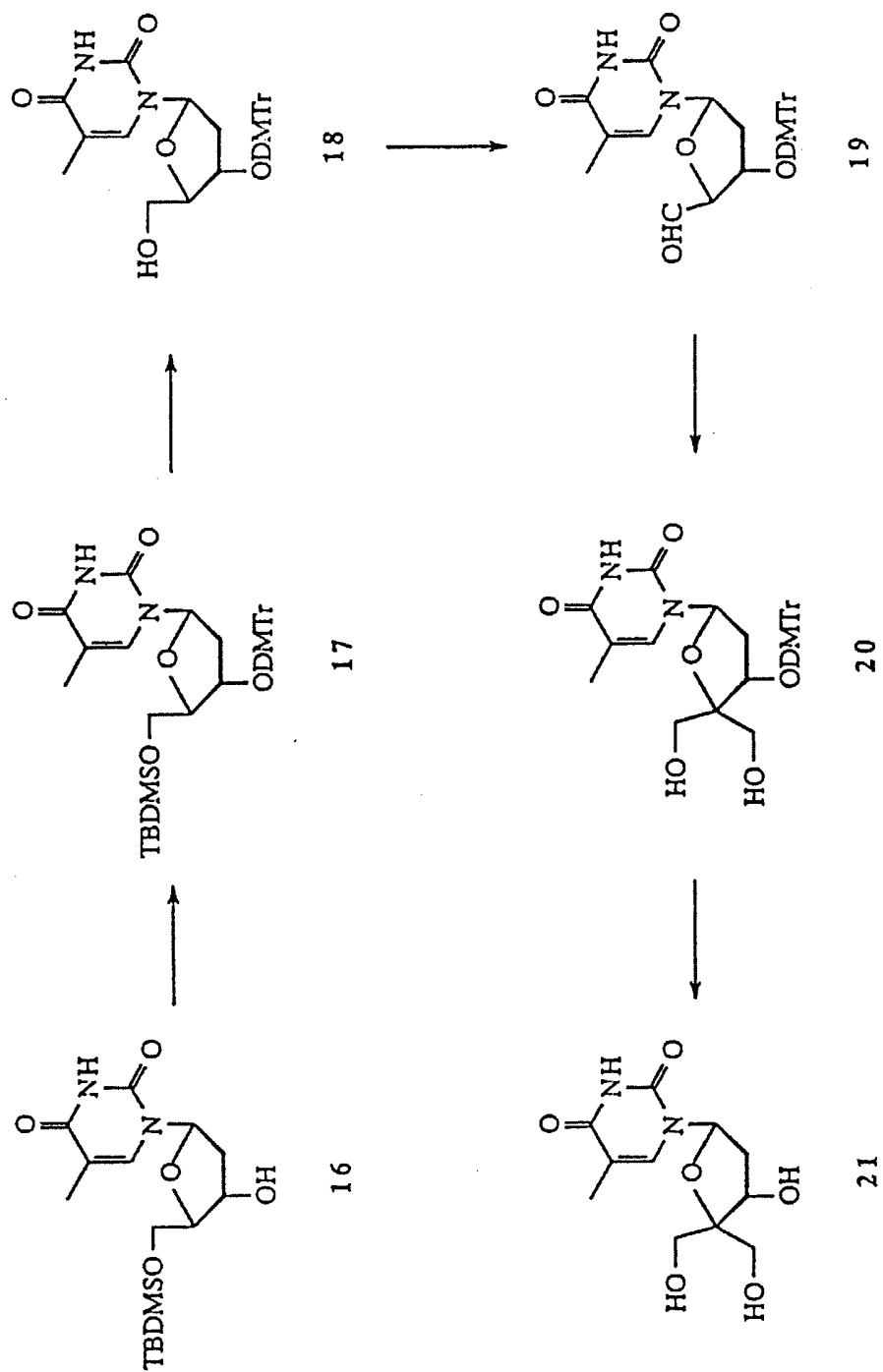
OBR. 2



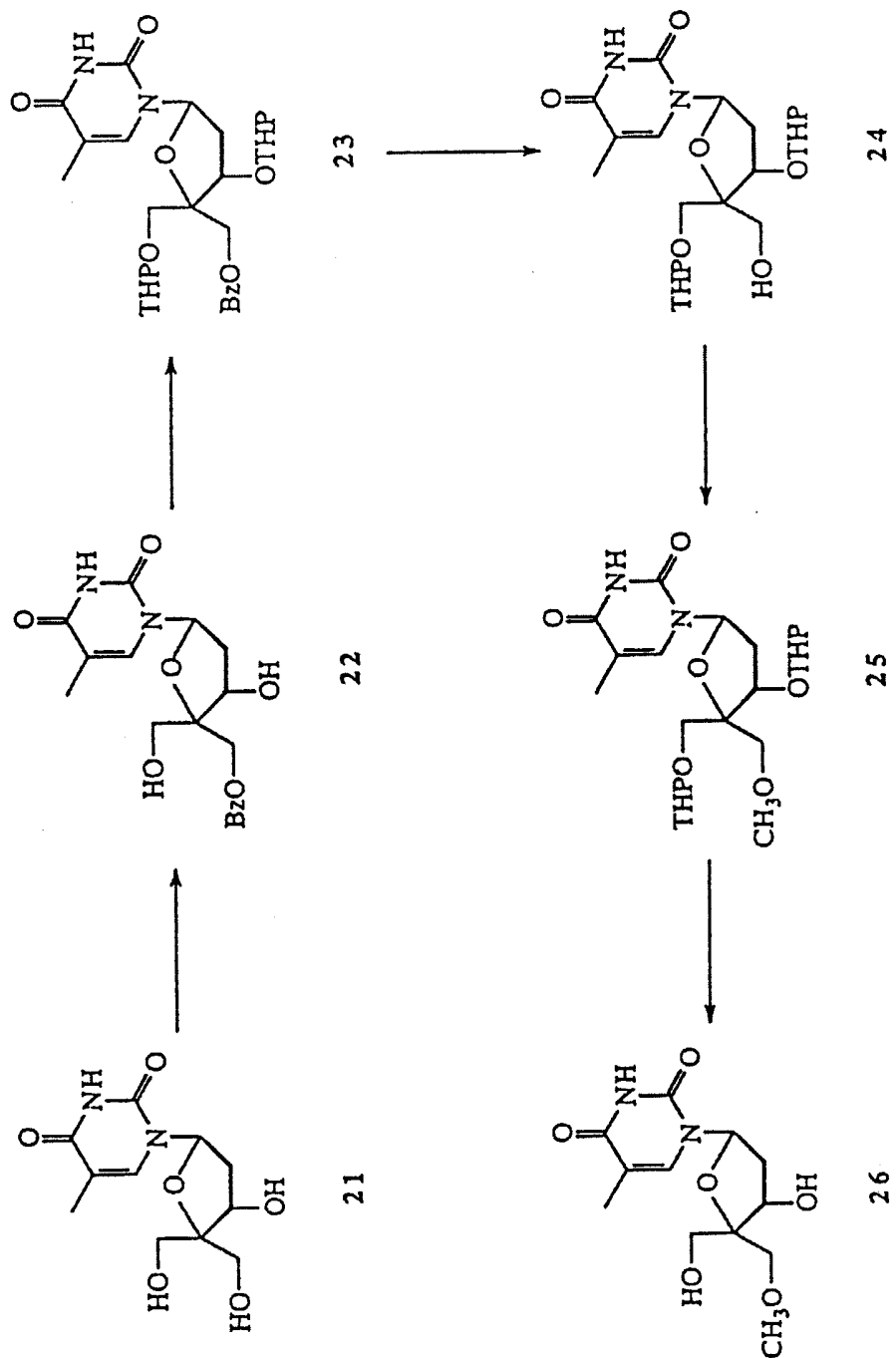
OBR. 3



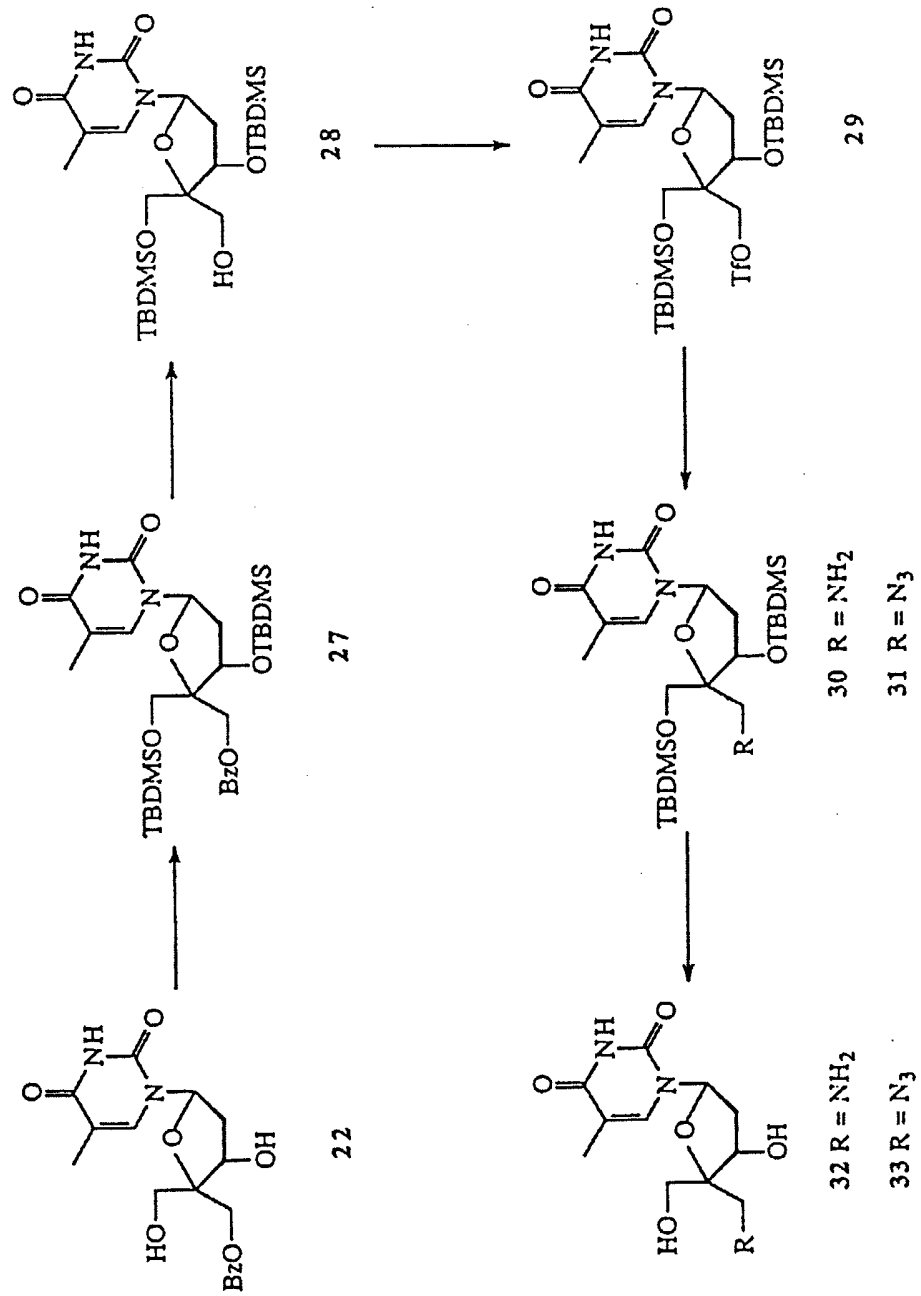
OBR. 4



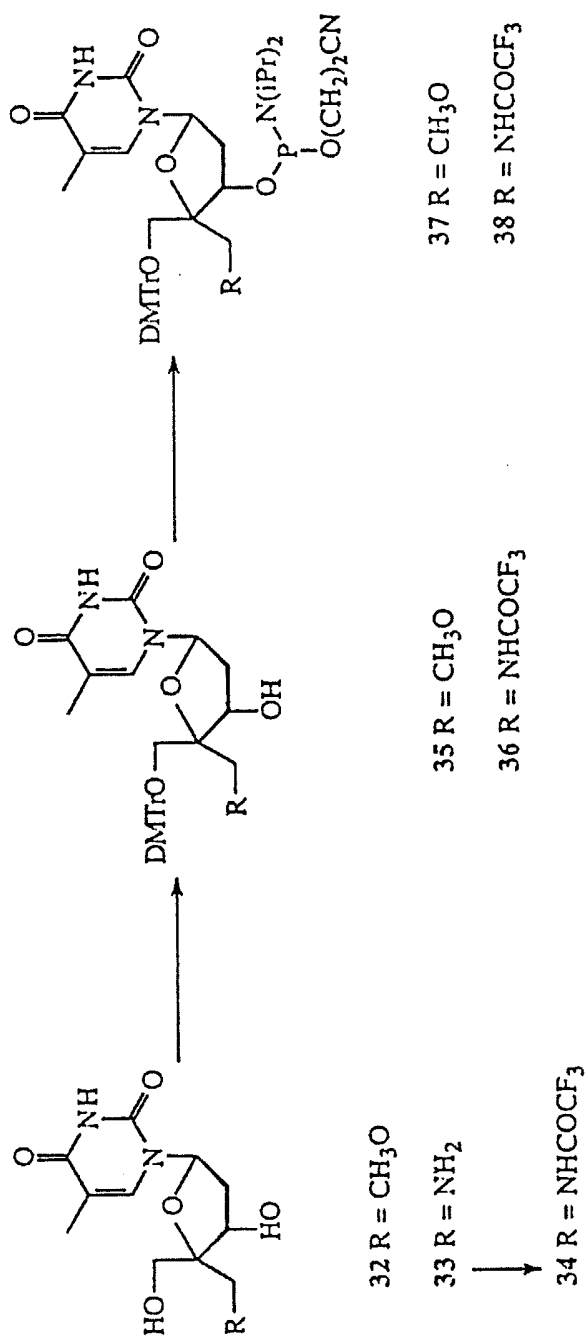
OBR. 5



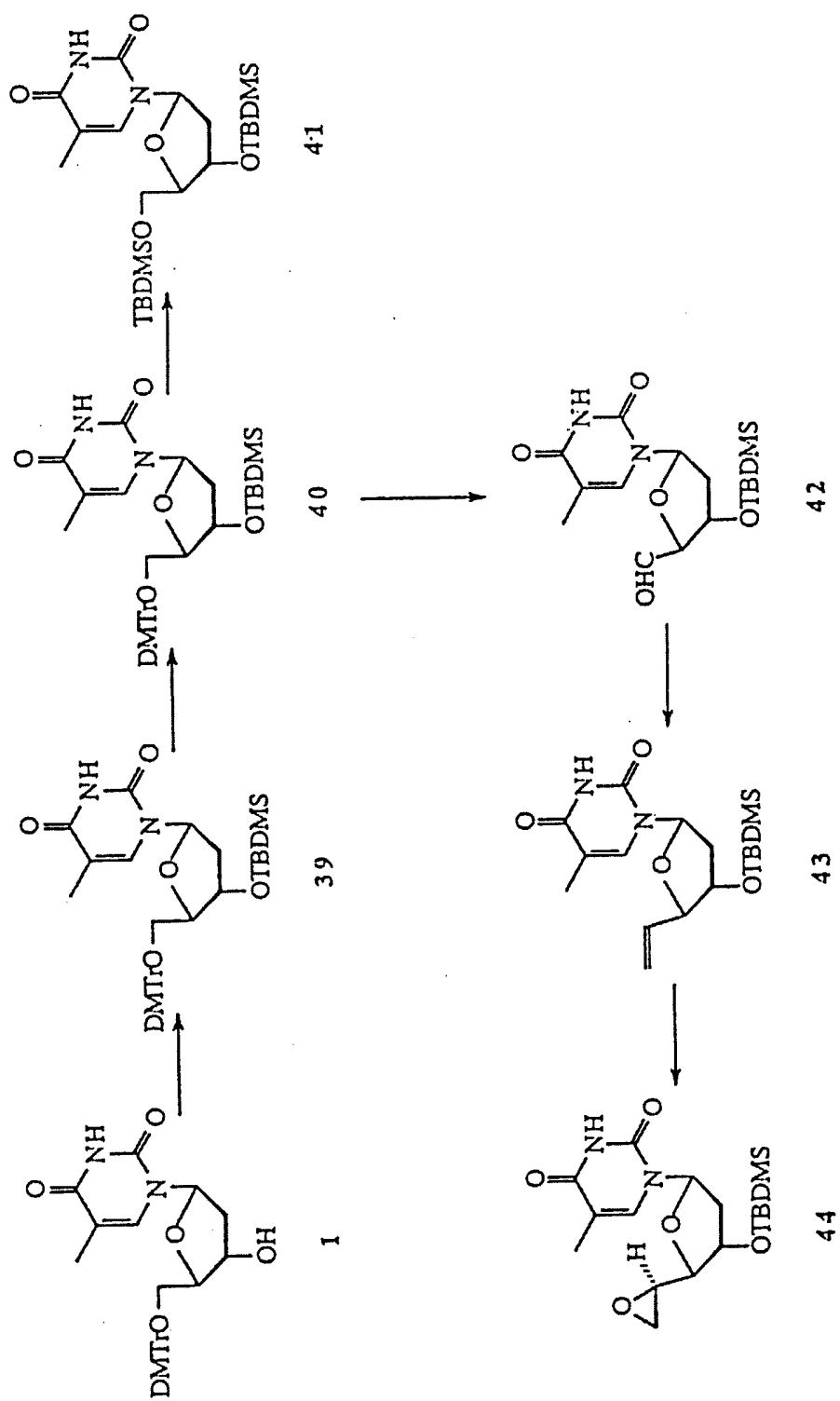
OBR. 6



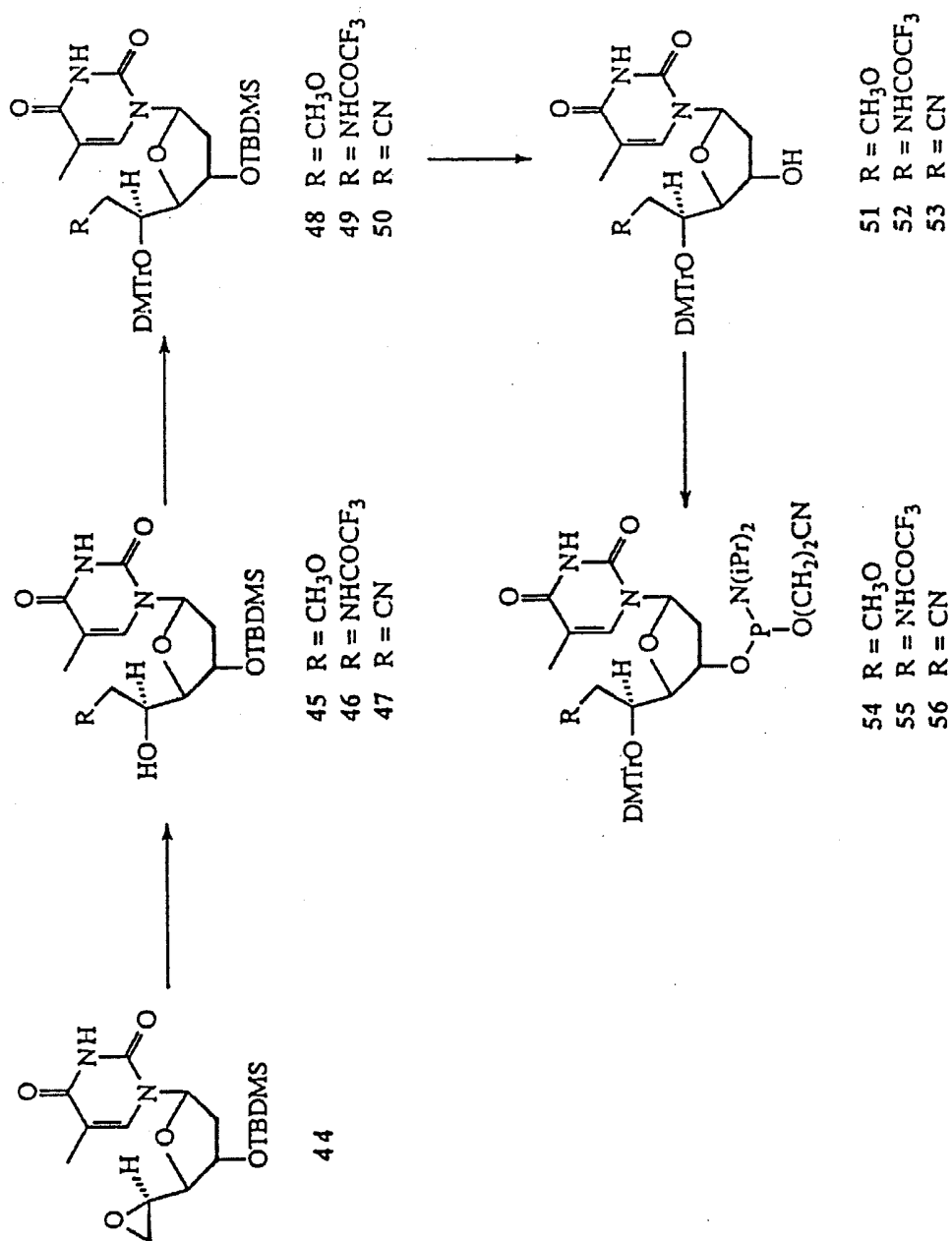
OBR. 7



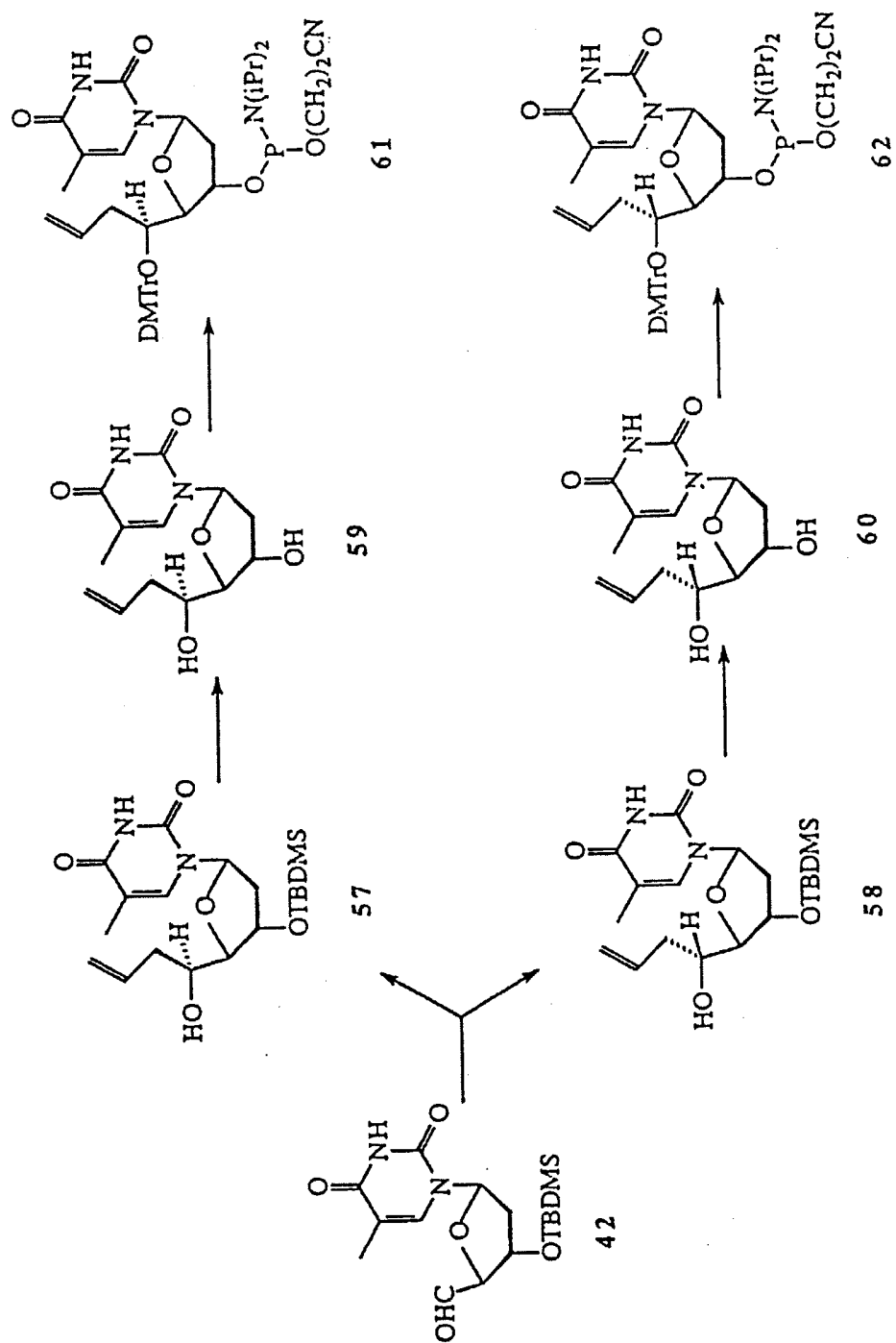
OBR. 8



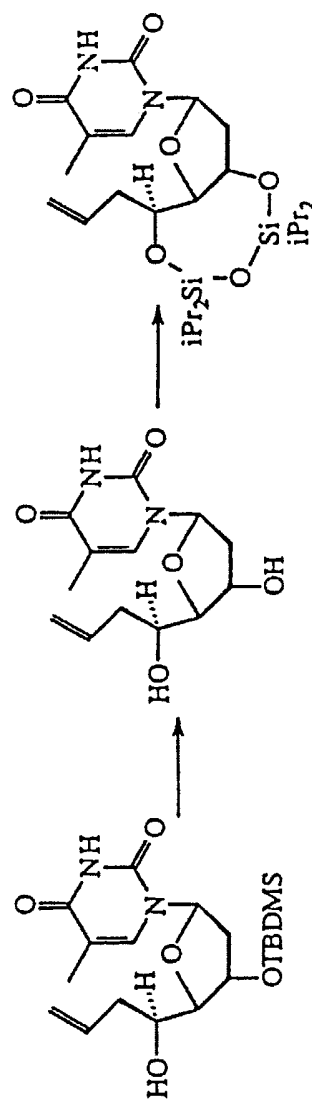
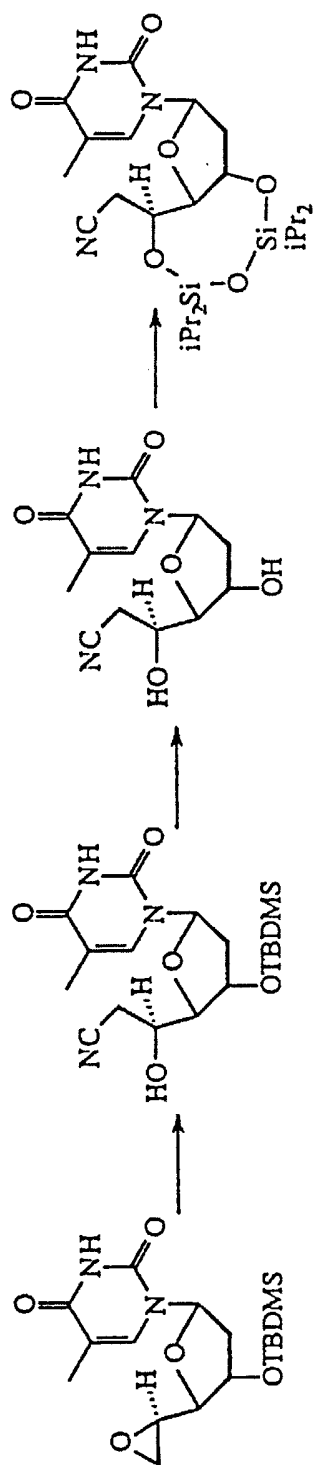
OBR. 9



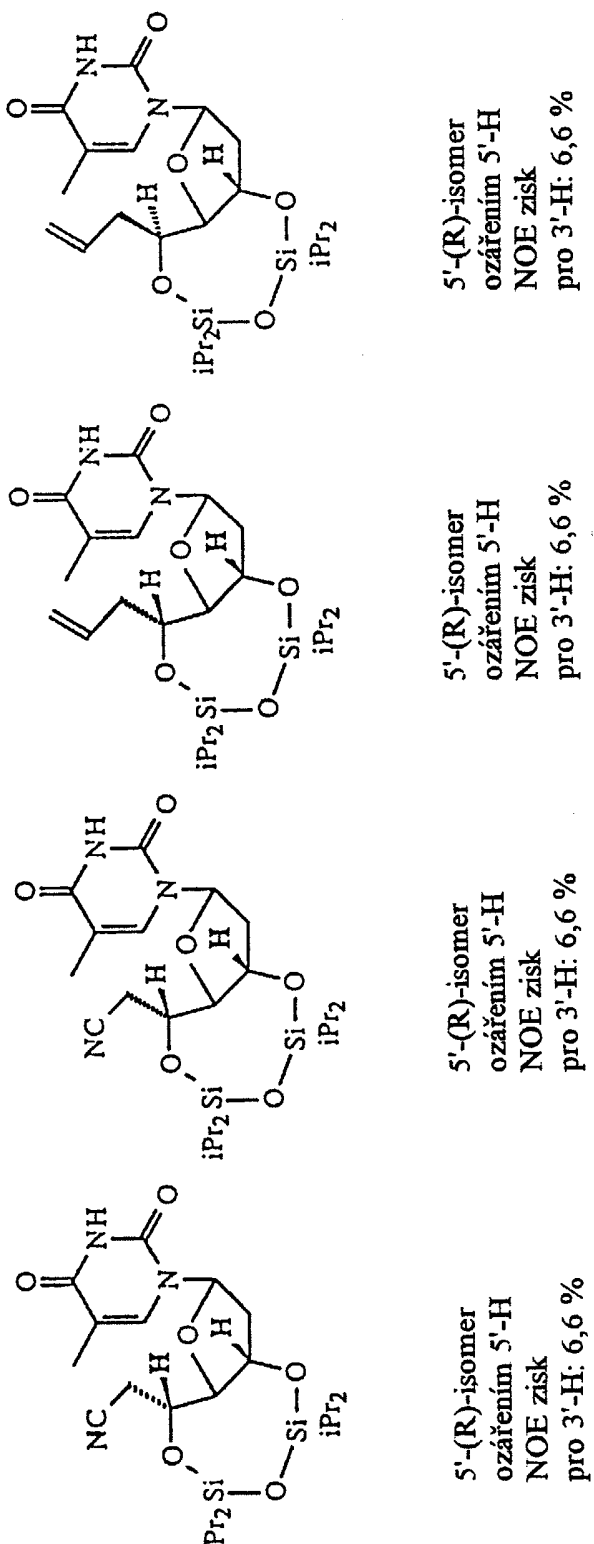
OBR. 10



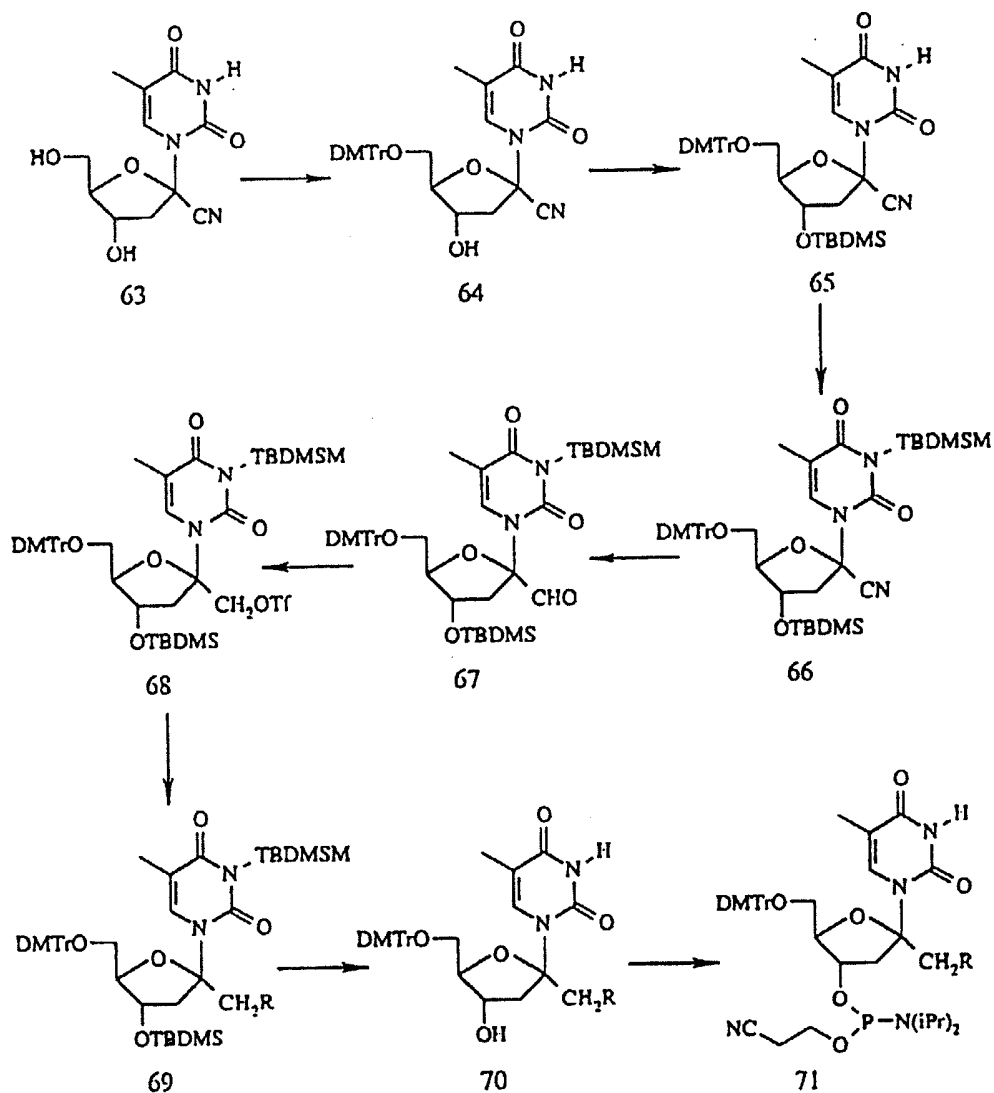
OBR. 11



OBR. 12

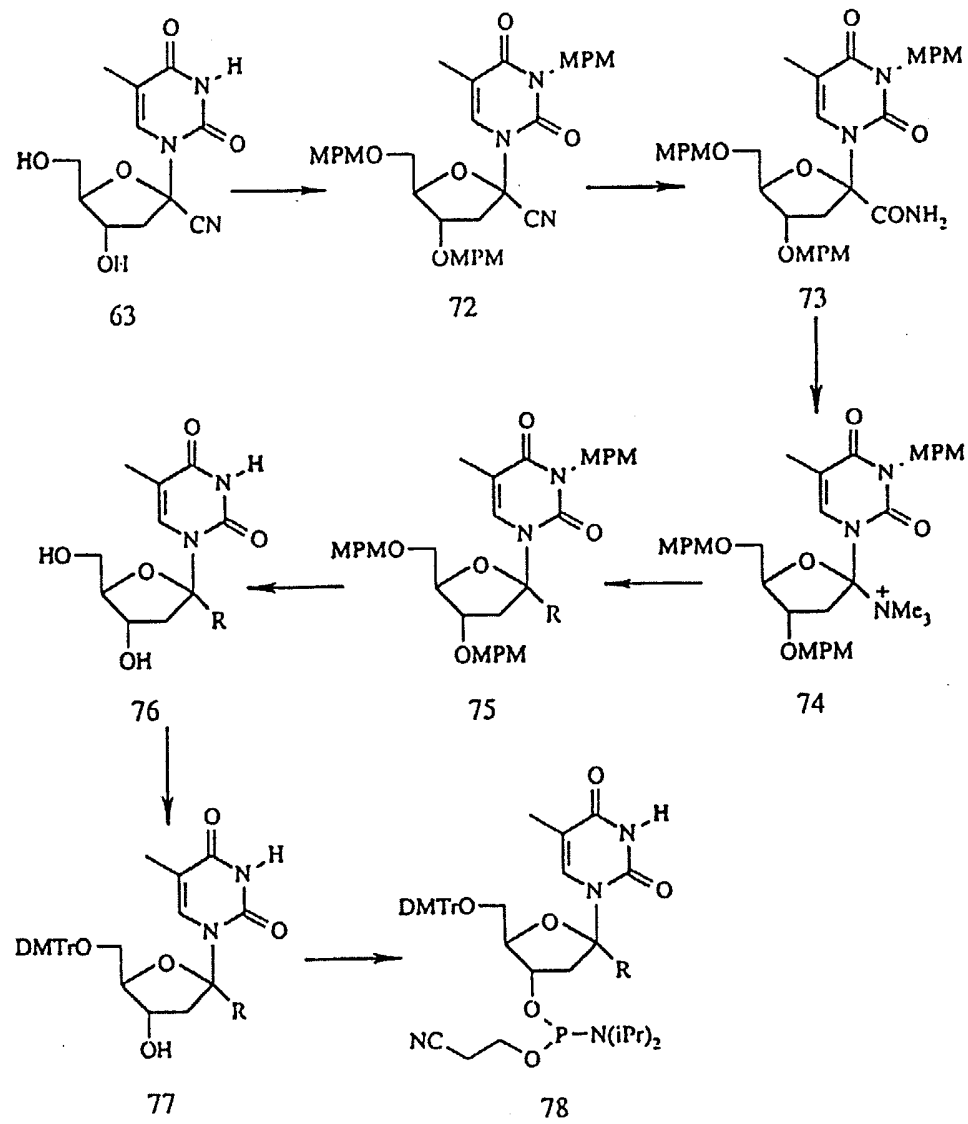


OBR. 13



TBDMSM = *t*-butyldimethylsiloxymethyl

OBR. 14



Konec dokumentu