



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 07 848 T2 2004.12.30**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 165 584 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 07 848.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB00/00965**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 909 534.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/56747**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.03.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **28.09.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **21.01.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.12.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C07H 19/04**
C07H 19/06, C07H 21/00

(30) Unionspriorität:
9906328 19.03.1999 GB

(73) Patentinhaber:
Avecia Ltd., Manchester, GB

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**REESE, Bernard,, Colin, London WC2R 2LS, GB;
SONG, Quanlai, San Marcos, US**

(54) Bezeichnung: **HERSTELLUNG VON 2'-SUBSTITUTierter RNS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Darstellung von 2'-O-substituierten Nukleosiden und insbesondere ein Verfahren zur Darstellung von 2'-O-substituiertem Uridin und Cytidin.

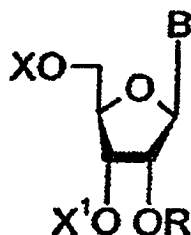
[0002] Ein Großteil der Forschungsarbeit in den letzten Jahren wurde durch die Möglichkeit stimuliert, daß es sich bei synthetischen Oligonukleotiden um wirksame Inhibitoren der Genexpression handeln könnte, die sich als Chemotherapeutika einsetzen ließen. Um ihren Abbau durch zelluläre Nukleasen zu vermeiden, sollten solche Oligonukleotide unbedingt modifiziert sein. Dabei können Modifikationen an den Internukleotidverknüpfungen, den Basenresten sowie den Zuckerresten vorgenommen werden. Eine große Anzahl an Oligonukleotidanalogen, bei denen die Internukleotidverknüpfungen modifiziert wurden, insbesondere als Phosphorothioate mit nicht-verbrückenden Schwefelatomen, wurde bereits beschrieben. Mehrere dieser Phosphorothioatanaloga sind vielversprechende Arzneistoffkandidaten, die nun klinisch getestet werden. Phosphorothioate besitzen jedoch einige Nachteile. So zeigen sie etwa keine optimalen RNA-Bindungseigenschaften und neigen ebenfalls dazu, Proteine nichtspezifisch zu binden. Mögliche Basenmodifikationen sind eindeutig dahingehend beschränkt, daß sie zu keiner signifikanten Abnahme der Hybridisierungseigenschaften führen dürfen. In letzter Zeit wurde beträchtliches Interesse auf die Modifikation der Zuckerreste gerichtet. Bei einer besonderen Art der Modifikation werden 2'- α -Alkoxygruppen eingeführt (siehe z. B. in 2'-O-Alkyloligonukleotiden). Während kleine Alkoxygruppen (siehe z. B. Methoxy) bessere Hybridisierungseigenschaften mit komplementären Ribonukleinsäuren (RNA) begünstigen, neigt eine Größenzunahme der Alkoxygruppe dazu, die Nukleaseresistenz zu erhöhen. Dabei hat sich 2-Methoxyethoxy als eine Alkoxygruppe herausgestellt, die sowohl gute Hybridisierungseigenschaften als auch eine hohe Nukleaseresistenz verleiht. Es scheint daher gut möglich zu sein, daß 2'-O-(2-Methoxyethyl)ribonukleoside in eine zweite Generation potentieller Oligonukleotid-Chemotherapeutika eingebaut werden. Aus diesem Grund wird der Entwicklung zweckmäßiger Verfahren zur Herstellung von 2'-O-(2-Methoxyethyl)ribonukleosiden inzwischen große Bedeutung beigemessen.

[0003] Die von der D-Ribose ausgehende Herstellung von 2'-O(2-Methoxyethyl)-ribonukleosiden wurde bereits beschrieben. Bei diesen Herstellungsverfahren wurden Schutzgruppen eingesetzt und eine relativ große Anzahl von Schritten benötigt. So wurde beispielsweise von Martin, P. *Helv. Chim. Acta* 1995, 78, 486–504 2'-O-(2-Methoxyethyl)-5-methyluridin aus D-Ribose in 10 Schritten und mit 33% Gesamtausbeute dargestellt. In einem späteren Bericht von McGee und Zhai in *Abstracts of American Chemical Society National Meeting*, Division of Organic Chemistry, März 1996, Arbeit Nr. 253, wurde eine wesentlich zweckmäßigere Verfahrensweise zur Herstellung von 2'-O-Alkylderivaten aus den Haupt-Pyrimidinribonukleosiden vorgestellt. So wurde beim Erhitzen von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2,2'-anhydro-1- β -D-arabinofuranosyluracil mit Magnesiummethanolat in N,N-Dimethylformamid (DMF) auf 100°C 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-methyluridin mit 94% Ausbeute erhalten. Etwas niedrigere Ausbeuten wurden für die entsprechenden 5'-O-Ethyl-, 5'-O-(n-Propyl)- und 5'-O-Allyluridin-Derivate bei den Umsetzungen desselben Substrats mit den entsprechenden Magnesiumalkoholaten erhalten. Es wurde ebenfalls berichtet, daß sich Magnesiumalkoholate durch Calciumalkoholate ersetzen ließen. Aus McGee et al *Nucleosides and Nucleotides* 1996, 15 (11&12), 1797–1803 ist die Darstellung von 2'-O-Alkyl-pyrimidinnukleosiden mit zweiwertigen Metallalkoholaten bekannt.

[0004] Von Ross et al. in *Nucleosides and Nucleotides*, 1997, 16, 1641–3 wurde berichtet, daß beim Erhitzen von ungeschütztem 2,2'-Anhydro-1- β -D-arabinofuranosyluracil mit einem zweifachen Überschuß an Borsäuretrimethylester sowie einer stöchiometrischen Menge an Orthoameisensäuretrimethylester in Methanol bei 150°C unter Druck für 42 h 2'-O-Methyluridin mit 86% isolierter Ausbeute erhalten wurde. In ähnlicher Weise wurde 2'-O-Methyl-5-methyluridin aus 2,2'-Anhydro-5-methyl-(1- β -D-arabinofuranosyluracil) mit dem Borsäureesterverfahren dargestellt, und die Darstellung von 2'-O-Methylcytidin wurde ebenfalls berichtet, obwohl keine experimentellen Einzelheiten zur Verfügung gestellt wurden. Es wurde erwähnt, daß die Ausbeute von 2'-O-Alkyluridin mit zunehmender Größe des Alkohols abnimmt. Aus WO 96/27606 ist die Synthese von 2'-O-substituierten Pyrimidinnukleosiden in Gegenwart von Lewis-Säuren, vor allem Borsäureestern, bekannt.

[0005] Es besteht weiterhin der Wunsch, zusätzliche oder alternative Wege für die Darstellung von 2'-O-substituierten Nukleosiden zu identifizieren.

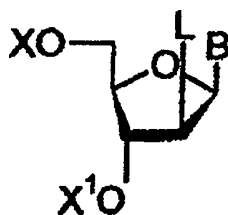
[0006] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird daher ein Verfahren zur Darstellung einer Verbindung der Formel (1)



wobei

X und X¹ jeweils unabhängig voneinander für H oder eine Schutzgruppe stehen;
B für eine Base; und

R für eine Alkyl-, Alkoxyalkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe, die jeweils gegebenenfalls substituiert sein kann, steht;
bereitgestellt,
bei dem eine Verbindung der Formel (2):



wobei

L für eine Abgangsgruppe steht; und

B, X und X¹ die oben angegebene Bedeutung besitzen,

mit einer Verbindung der Formel $Al(OR)_3$, wobei R die oben angegebene Bedeutung besitzt, unter weitgehend wasserfreien Bedingungen umgesetzt wird.

[0007] Steht R für Alkenyl, so handelt es sich bei der Alkenylgruppe häufig um eine C_{2-4} -Alkenylgruppe, vor allem um eine Allyl- oder Crotylgruppe. Bedeutet R Alkyl, so handelt es sich bei der Alkylgruppe vorzugsweise um ein C_{1-4} -Alkyl und ganz besonders bevorzugt um eine Methyl- oder Ethylgruppe. Bedeutet R Alkoxyalkyl, so handelt es sich bei der Alkoxyalkylgruppe oftmals um eine C_{1-4} -Alkoxy- C_{1-4} -alkylgruppe und vorzugsweise um eine Methoxyethylgruppe. Steht R für Alkynyl, so handelt es sich bei der Alkynylgruppe häufig um eine C_{2-4} -Alkynylgruppe, vor allem um eine Propargylgruppe. Die Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl- und Alkoxyalkylgruppen können selbst mit einem oder mehreren Substituenten, insbesondere Halogen, vor allem F, Cl oder Br, sowie Aminosubstituenten substituiert sein.

[0008] Zu den Schutzgruppen, für die X und X¹ stehen können, gehören beispielsweise säurelabile Schutzgruppen, insbesondere Trityl- und substituierte Tritylgruppen, wie z. B. Dimethoxytrityl- und 9-Phenylxanthen-9-ylgruppen; säurelabile Acetalschutzgruppen, insbesondere 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl (Fmp); sowie basenlabile Schutzgruppen, wie z. B. Acylgruppen, die üblicherweise bis zu 16 Kohlenstoffatome enthalten, wie z. B. Ethanoylgruppen oder Fettsäurealkanoylgruppen, einschließlich insbesondere linearer oder verzweigter C_{6-16} -Alkanoylgruppen, wie z. B. Lauroylgruppen; Benzoyl- und substituierte Benzoylgruppen, wie z. B. Alkyl-, üblicherweise C_{1-4} -Alkyl-, und Halogen-, üblicherweise Chlor- oder Fluor-, substituierte Benzoylgruppen.

[0009] Als Schutzgruppen sind ebenfalls die von Gamma-Ketosäuren abgeleiteten Schutzgruppen, wie z. B. Levulinoylgruppen und substituierte Levulinoylgruppen, geeignet. Zu den substituierten Levulinoylgruppen gehören 5-Halogenlevulinoyl-, wie z. B.

5,5,5-Trifluorlevulinoyl-, und Benzoylpropionylgruppen; sowie Silyl- und Siloxanether, wie z. B. Alkyl-, üblicherweise C_{1-4} -Alkyl-, und Aryl-, üblicherweise Phenyl, Silylether, insbesondere Trialkylsilylgruppen, häufig Tri(C_{1-4} -alkyl)silylgruppen, wie z. B. tertiäres-Butyldimethylsilyl- und tertiäres-Butyl-diphenylsilylgruppen.

[0010] Zu den Basen, für die B stehen kann, gehören Nukleobasen, insbesondere Purine, vor allem Adenin (A) und Guanin (G); sowie Pyrimidine, vor allem Thymin (T), Cytosin (C) und Uracil (U); sowie substituierte Derivate davon. Zu den Substituenten, die zusätzlich zu den Schutzgruppen die Basen substituieren können, gehören beispielsweise Alkyl-, vor allem C_{1-4} -Alkyl-, insbesondere Methyl-, Halogen-, insbesondere Cl- oder Br-, Amino-, Alkenyl-, vor allem C_{1-4} -Alkenyl- und insbesondere Allyl-, Alkoxyalkyl-, vor allem C_{1-4} -Alkoxy- C_{1-4} -alkyl-, insbesondere Methoxyalkyl-, sowie Alkynyl-, insbesondere Propargyl-, Substituenten. Die Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl- und Alkoxyalkylgruppen können ihrerseits mit einem oder mehreren Substituenten, insbesondere Halogen-, vor allem F, Cl oder Br, und Aminosubstituenten substituiert sein.

[0011] Zusätzlich zur Gegenwart der Schutzgruppen X und X¹ können die in der vorliegenden Erfindung eingesetzten Basen auch nötigenfalls durch geeignete Schutzgruppen geschützt sein. Die dabei zum Schutz solcher Basen eingesetzten Schutzgruppen sind im Fachgebiet bekannt. So lassen sich beispielsweise A und/oder C durch Benzoyl, einschließlich substituiertem Benzoyl, z. B. Alkyl- oder Alkoxy-, häufig C_{1-4} -Alkyl- oder C_{1-4} -Alkoxy-, benzoyl; Pivaloyl; und Amidin, vor allem Dialkylaminomethylen, vorzugsweise Di(C_{1-4} -alkyl)aminomethylen, wie z. B. Dimethyl- oder Dibutylaminomethylen, schützen. G kann durch eine Phenylgruppe, einschließlich substituiertem Phenyl, z. B. 2,5-Dichlorphenyl, und ebenso durch eine Isobutyrylgruppe geschützt werden. T und U werden im allgemeinen nicht geschützt, können jedoch in gewissen Ausführungsformen vorteilhafterweise geschützt werden, beispielsweise am O4 durch eine Phenylgruppe, einschließlich substituiertem Phenyl, z. B. 2,4-Dimethylphenyl, oder am N3 durch ein Pivaloyloxymethyl, Benzoyl, Alkyl- oder Alkoxy-substituiertes Benzoyl, wie z. B. C_{1-4} -Alkyl- oder C_{1-4} -Alkoxybenzoyl.

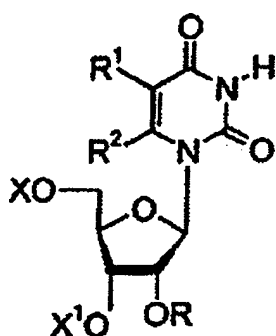
[0012] In gewissen Ausführungsformen handelt es sich bei X und X¹ um eine einzige Schutzgruppe, die sowohl die 3'- als auch die 5'-Position schützt. Zu solchen Gruppen gehören beispielsweise Disiloxane, vor allem Tetraalkyldisiloxane, wie z. B. Tetraisopropyldisiloxan.

[0013] Zu den Abgangsgruppen, für die L stehen kann, gehören solche Abgangsgruppen, die sich durch ein Nukleophil der Formel R^O- verdrängen las-

sen. Zu den bevorzugten Abgangsgruppen gehören beispielsweise Gruppen der Formel $-\text{OSO}_2\text{CH}_3$, $-\text{OSO}_2\text{CF}_3$, Cl, Br, I, O-Mesyl-, O-Brosyl- und O-Tosylgruppen.

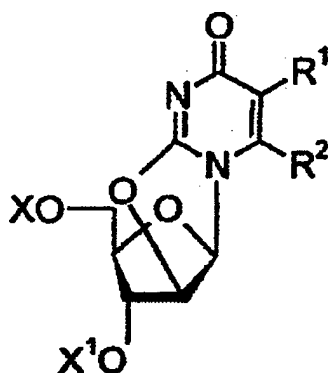
[0014] In gewissen bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei der Abgangsgruppe um die Base B, die chemisch in 2'-Stellung gebunden ist, üblicherweise über ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder eine Gruppe der Formel $-\text{NR}^X$, wobei R^X für H oder eine C_{1-6} -Alkyl- oder Aryl-, z. B. eine Phenyl-, Gruppe steht. Ganz besonders bevorzugt handelt es sich bei der Base um ein in 2'-Stellung über ein Sauerstoffatom gebundenes Uracil.

[0015] Dementsprechend wird in einem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Darstellung einer Verbindung der Formel (3):



wobei

X und X^1 die oben angegebene Bedeutung besitzen; R^1 und R^2 jeweils unabhängig voneinander für H, Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Halogen stehen; und R für eine Alkyl-, Alkoxyalkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe, die jeweils gegebenenfalls substituiert sein kann, steht; bereitgestellt, bei dem eine Verbindung der Formel (4)



wobei

X, X^1 , R^1 und R^2 die oben angegebene Bedeutung besitzen; mit einer Verbindung der Formel $\text{Al}(\text{OR})_3$, wobei R die oben angegebene Bedeutung besitzt, unter weitgehend wasserfreien Bedingungen umgesetzt wird.

[0016] Steht R^1 oder R^2 jeweils für Alkenyl; so handelt es sich bei der Alkenylgruppe häufig um eine

C_{2-4} -Alkenylgruppe, vor allem eine Allyl- oder Crotylgruppe. Bedeutet R^1 oder R^2 jeweils Alkyl, so handelt es sich bei der Alkylgruppe vorzugsweise um eine C_{1-4} -Alkyl- und ganz besonders bevorzugt um eine Methyl- oder Ethylgruppe. Bedeutet R^1 oder R^2 jeweils Alkoxyalkyl, so handelt es sich bei der Alkoxyalkylgruppe häufig um eine C_{1-4} -Alkoxy- C_{1-4} -alkylgruppe und vorzugsweise um eine Methoxyethylgruppe. Steht R^1 oder R^2 jeweils für Alkynyl, so handelt es sich bei der Alkynylgruppe häufig um eine C_{2-4} -Alkynylgruppe, vor allem eine Propargylgruppe. Die Alkyl-, Alkenyl- und Alkynylgruppen, für die R^1 oder R^2 steht, können mit einem oder mehreren Substituenten, insbesondere Halogen, vor allem F, Cl oder Br, und Aminosubstituenten, substituiert sein. Steht R^1 oder R^2 jeweils für Halogen, so handelt es sich bei dem Halogen vorzugsweise um Cl, Br oder I. Ganz besonders bevorzugt bedeuten sowohl R^1 und R^2 jeweils H, oder R^1 bedeutet C_{1-4} -Alkyl und R^2 bedeutet H.

[0017] Das erfindungsgemäße Verfahren findet in Gegenwart eines geeigneten, weitgehend wasserfreien Lösungsmittels statt. Zu den geeigneten Lösungsmitteln gehören beispielsweise Halogenkohlenstoffe, wie z. B. Chloroform, 1,2-Dichlorethan und Chlorbenzol; Ester, insbesondere Alkylester, wie z. B. Essigsäureethylester, und Propionsäuremethyl- oder -ethylester; Amide, wie z. B. N-Methylpyrrolidin, Dimethylformamid und insbesondere Dimethylacetamid; niederes Alkyl, z. B. C_{2-4} -Nitril, wie z. B. Acetonitril; Ether, wie z. B. Glyme und Diglyme und cyclische Ether, wie z. B. Tetrahydrofuran und Dioxan; tertiäre Amine, wie z. B. N-Methylpyrrolidin, und heterocyclische aromatische Amine, wie z. B. Pyridin, sowie Alkohole, am üblichsten der Alkohol, der der Gruppe R entspricht, z. B. Methanol, Ethanol, Methoxyethanol, Allylalkohol oder Propargylalkohol.

[0018] Das erfindungsgemäße Verfahren wird häufig bei einer Temperatur durchgeführt, die von Raumtemperatur, wie z. B. etwa 25°C , bis zur Rückflusstemperatur des eingesetzten Lösungsmittels reicht. Temperaturen oberhalb des normalen Siedepunkts des eingesetzten Lösungsmittels können gewünschtenfalls verwendet werden, indem das Verfahren unter Überdruckbedingungen, beispielsweise in einem abgeschlossenen Reaktionsgefäß, durchgeführt wird. Die Temperatur liegt üblicherweise in einem Bereich von 50 bis 150°C .

[0019] Das Verfahren wird üblicherweise über einen Zeitraum von mehreren Stunden, beispielsweise 4 bis 12 Stunden, bis zu mehreren Tagen, beispielsweise 1 bis 2 Tagen, durchgeführt, je nach den verwendeten Reagentien und Reaktionsbedingungen.

[0020] Enthält die Verbindung der Formel (1) die Base Uracil, so kann der Uracilteil in einen Cytosinteil umgewandelt werden. Analog kann der in der Verbin-

derung der Formel (3) enthaltene Uracilteil ebenso in einen Cytosinteil umgewandelt werden. Dem Fachmann ist ersichtlich, daß dabei eine Reihe unterschiedlicher Techniken eingesetzt werden kann. Zu solchen Techniken gehören beispielsweise:

[0021] a) der Nitrophenylweg (siehe Miah et al., Nucleosides and Nucleotides, 1997, 16, S. 53–65), bei dem man beispielsweise die uracilhaltige Verbindung mit Chlortrimethylsilan in Acetonitril/1-methylpyrrolidin und danach mit Trifluoressigsäureanhydrid sowie anschließend mit 4-Nitrophenol umgesetzt. Der 4-Nitrophenolteil wird dann mit Ammoniak in wäßrigem Dioxan unter Erhalt der cytosinhaltigen Verbindung verdrängt; und

[0022] b) das Triazolierungsverfahren (siehe Divakar et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1982, 1171–6), bei dem man beispielsweise die uracilhaltige Verbindung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin und dann nach Aufarbeitung mit Phosphorylchlorid, 1,2,4-Triazol und Triethylamin in Acetonitril unter Erhalt des 4-Triazolopyrimidins umgesetzt. Der Triazolteil wird dann mit Ammoniak in wäßrigem Dioxan verdrängt und nach Entfernung der Acetylgruppen die cytosinhaltige Verbindung erhalten.

[0023] Die Schutzgruppen lassen sich mit im Fachgebiet für die jeweilige Schutzgruppe und -funktion bekannten Verfahren abtrennen. So lassen sich Acylschutzgruppen, wie z. B. Ethanoyl- und Benzoylgruppen, beispielsweise durch Behandlung mit einer Ammoniaklösung in einem Alkohol, wie z. B. Ethanol, abtrennen.

[0024] Benzoyl-, Pivaloyl- und Amidingruppen lassen sich durch Behandlung mit konzentriertem wäßrigem Ammoniak abtrennen.

[0025] Vorhandene Tritylgruppen lassen sich durch Behandlung mit Säure, beispielsweise einer Lösung aus Dichloressigsäure in Dichlormethan, abtrennen. Im Hinblick auf die Gesamt-Deblockierungsstrategie besteht ein wichtiger zu berücksichtigender Punkt darin, daß die Abtrennung von Trityl-, häufig DMTr-, Schutzgruppen ("Detritylierung") ohne gleichzeitige Depurinierung ablaufen sollte, wenn die Base B ein Pürin, vor allem Adenin, bedeutet. Eine solche Depurinierung läßt sich unterdrücken, indem die "Detritylierung" mit einer verdünnten Lösung von Hydrogenchlorid bei niedriger Temperatur, insbesondere mit einer Lösung von ca. 0,45 M Hydrogenchlorid in Dioxan-Dichlormethan (1 : 8 v/v) bei –50°C, durchgeführt wird. Unter diesen Reaktionsbedingungen läßt sich die "Detritylierung" schnell und vollständig durchführen, und zwar in gewissen Fällen in 5 Minuten oder weniger.

[0026] Silyl-Schutzgruppen können durch Fluoridbehandlung, beispielsweise mit einer Lösung eines

Tetraalkylammoniumfluoridsalzes, wie z. B. Tetrabutylammoniumfluorid, abgetrennt werden.

[0027] Fmp-Schutzgruppen können durch saure Hydrolyse unter milden Bedingungen abgetrennt werden.

[0028] Erfindungsgemäß dargestellte Verbindungen können bei der Konstruktion eines gewünschten Oligonukleotids durch Kopplung mit anderen Nukleosiden oder Oligonukleotiden (die ihrerseits erfindungsgemäß hergestellt worden sein können) eingebaut werden, wobei ein solches Verfahren einen weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung bildet. Dabei werden die im Fachgebiet zur Herstellung von Oligonukleotiden bekannten Kopplungsverfahren eingesetzt.

[0029] Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele weiter erläutert, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein.

Allgemeine experimentelle Einzelheiten

[0030] Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden in einem Bruker-AM 360-Spektrometer bei 360,1 bzw. 90,6 MHz gemessen; dabei wurde Tetramethylsilan als interner Standard verwendet. TLC wurde mit mit Kieselgel 60-F₂₅₄ vorbeschichteten Platten von Merck (Art.-Nr. 5715), die im Lösungsmittelsystem A [CHCl₃-MeOH (85 : 15 v/v)] entwickelt wurden, durchgeführt. Die Chromatographie wurde auf einer kurzen Kieselgelsäule (Merck, Art.-Nr. 7729) durchgeführt. Acetonitril und 1-Methylpyrrolidin wurden durch Erhitzen unter Rückfluß mit Calciumhydrid getrocknet und anschließend destilliert. N,N-Dimethylacetamid (DMA) wurde durch Destillation über Calciumhydrid unter vermindertem Druck getrocknet. 2-Methoxyethanol wurde durch Erhitzen unter Rückfluß mit Aluminiumfolie (1 g/250 ml) getrocknet und danach destilliert. Diethylether wurde über Natriumdraht getrocknet.

Darstellung von 2,2'-Anhydro-1-(3-D-arabinofuranosyl)uracil

[0031] Uridin (12,21 g, 50 mmol), Diphenylcarbonat (11,79 g, 55 mmol), Natriumhydrogencarbonat (0,21 g, 2,5 mmol) und trockenes DMA (10 ml) wurden unter Rühren bei 100°C zusammen erhitzt. Nach 5 h wurden die Produkte auf Raumtemperatur abgekühlt und unter Rühren mit Diethylether (100 ml) versetzt. Nach 2 Stunden wurde der farblose Niederschlag (11,70 g) durch Filtration gesammelt und mit Ether gewaschen (2 × 50 ml). Der einzige Nukleosidbestandteil des ausgefallenen Materials wurde durch Vergleich mit authentischem Material als 2,2'-Anhydro-1-β-D-arabinofuranosyluracil identifiziert (berechnete quantitative Ausbeute: 11,31 g).

Darstellung von 2'-O-(2-Methoxyethyl)uridin

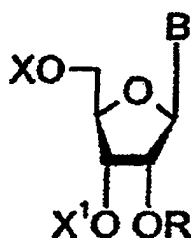
Patentansprüche

[0032] Aluminiumfolie (3,64 g, 0,135 mol) und trockenes 2-Methoxyethanol (135 ml) wurden ca. 1 Std. unter Rückfluß erhitzt, bis das Aluminium vollständig verbraucht war. Rohes (siehe oben) 2,2'-Anhydro-1- β -Darabinofuranosyluracil (10,18 g, ca. 43,5 mmol) wurde zugegeben, wonach die Reaktanden 48 Stunden am Rückfluß erhitzt wurden. Danach wurden die abgekühlten Produkte mit absolutem Ethanol (200 ml) und anschließend mit Wasser (7,3 ml, 0,405 mol) und Celite versetzt. Das erhaltene Gemisch wurde 10 Minuten unter Rückfluß erhitzt und danach filtriert. Der Rückstand wurde mit Ethanol gewaschen (3 $\times$ 100 ml). Das Filtrat und die Waschlösungen wurden vereinigt und anschließend unter vermindertem Druck eingedampft, so daß ein blaßgelber Feststoff erhalten wurde. Das Material wurde durch Chromatographie an einer kurzen Kieselgelsäule (70 g) gereinigt: die mit Dichlormethan-Methanol (90 : 10 v/v) eluierten entsprechenden Fraktionen wurden unter vermindertem Druck eingedampft, so daß die Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten wurde (12,05 g, ca. 91%).

Darstellung von 2'-O-(2-Methoxyethyl)cytidin

[0033] 2'-O-(2-Methoxyethyl)uridin (6,05 g, 20 mmol), 1-Methylpyrrolidin (20 ml, 0,192 mol), Chlortrimethylsilan (7,6 ml, 59,9 mmol) und trockenes Acetonitril (100 ml) wurden zusammen bei Raumtemperatur gerührt. Nach 1 Stunde wurden die Reaktanden auf 0°C (Eis-Wasser-Bad) abgekühlt, und Trifluorsäureanhydrid (7,1 ml, 50,3 mmol) wurde über 5 Minuten zutropft. Nach weiteren 30 Minuten bei 0°C wurden die bei 0°C erhaltenen Reaktanden unter Rühren mit 4-Nitrophenol (8,35 g, 60 mmol) versetzt. Nach 3 Stunden wurden die Produkte in gesättigtes wäßriges Natriumhydrogencarbonat (200 ml) gegossen und das erhaltene Gemisch wurde mit Dichlormethan extrahiert (3 $\times$ 100 ml). Die vereinigten organischen Schichten wurden getrocknet (MgSO_4) und unter vermindertem Druck eingedampft. Eine in einem verschlossenen Kolben enthaltene Lösung des Rückstands in Dioxan (100 ml) wurde unter Rühren mit konzentriertem wäßrigem Ammoniak (d 0,88, 20 ml) versetzt und der Kolben anschließend 24 Stunden bei 55°C erhitzt. Die erhaltene gelbe Lösung wurde unter vermindertem Druck konzentriert und der Rückstand mit absolutem Ethanol (3 $\times$ 50 ml) eingedampft. Die Produkte wurden durch Chromatographie auf einer kurzen Kieselgelsäule aufgetrennt: die mit Dichlormethan-Methanol-Triethylamin (93 : 7 : 0,5 bis 90 : 10 : 0,5 v/v) eluierten entsprechenden Fraktionen wurden unter vermindertem Druck eingedampft, so daß die Titelverbindung als schmutzigweißer Feststoff erhalten wurde (5,07 g 84%).

1. Verfahren zur Darstellung einer Verbindung der Formel (1):



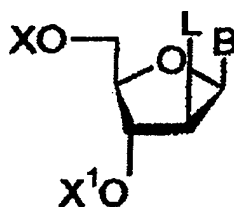
wobei

X und X' jeweils unabhängig voneinander für H oder eine Schutzgruppe stehen;

B für eine Base; und

R für eine Alkyl-, Alkoxyalkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe, die jeweils gegebenenfalls substituiert sein kann, steht;

bei dem eine Verbindung der Formel (2):

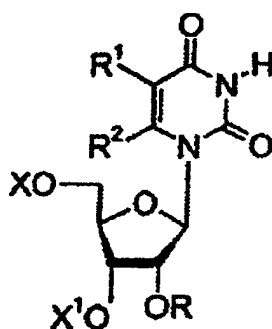


wobei L für eine Abgangsgruppe steht; und

B, X und X' die oben angegebene Bedeutung besitzen, mit einer Verbindung der Formel Al(OR)_3 , wobei R die oben angegebene Bedeutung besitzt, unter weitgehend wasserfreien Bedingungen umgesetzt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Abgangsgruppe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus $-\text{OSO}_2\text{CH}_3$, $-\text{OSO}_2\text{CF}_3$, Cl, Br, I, O-Mesyl, O-Brosyl, O-Tosyl und die Base B über ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder einen Teil mit der Formel $-\text{NR}^x$, wobei R^x für H oder eine C_{1-6} -Alkyl- oder eine Arylgruppe steht, in 2'-Stellung chemisch gebunden ist.

3. Verfahren zur Darstellung einer Verbindung der Formel (3):



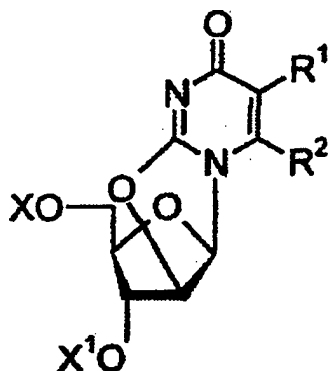
wobei

X und X' jeweils unabhängig voneinander für H oder

eine Schutzgruppe stehen;

R^1 und R^2 jeweils unabhängig voneinander für H, Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Halogen stehen; und R für eine Alkyl-, Alkoxyalkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe, die jeweils gegebenenfalls substituiert sein kann, steht;

bei dem eine Verbindung der Formel (4)



wobei

X, X^1 , R^1 und R^2 die oben angegebene Bedeutung besitzen;

mit einer Verbindung der Formel $Al(OR)_3$, wobei R die oben angegebene Bedeutung besitzt, unter weitgehend wasserfreien Bedingungen umgesetzt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei sowohl R^1 als auch R^2 für H stehen oder R^1 für C_{1-4} -Alkyl und R^2 für H steht.

5. Verfahren nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei R für eine C_{2-4} -Alkenylgruppe, eine C_{1-4} -Alkylgruppe, eine C_{1-4} -Alkoxy- C_{1-4} -Alkylgruppe oder eine C_{2-4} -Alkynylgruppe steht.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei R für eine Methoxyethylgruppe steht.

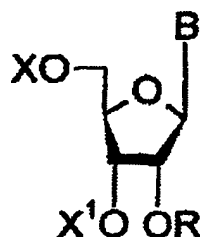
7. Verfahren zur Darstellung einer Verbindung der Formel (1), wobei B Cytosin oder ein substituiertes Derivat davon bedeutet, bei welchem Verfahren:

a) eine Verbindung der Formel (1), wobei B Uracil oder ein substituiertes Derivat davon bedeutet, mit einem Verfahren nach Anspruch 1 dargestellt; und
b) der Uracilteil in dem äquivalenten Cytosinteil umgewandelt; oder

c) eine Verbindung der Formel (3) mit einem Verfahren gemäß Anspruch 2 dargestellt; und d) der darin vorhandene Uracilteil in einen Cytosinteil umgewandelt wird.

8. Verfahren zur Herstellung eines Produktoligonukleotids, bei dem:

a) eine Verbindung der Formel (1):



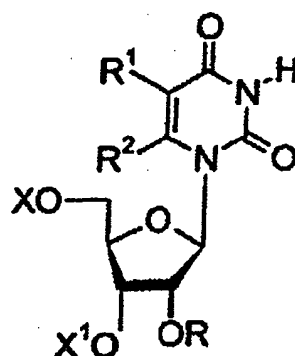
wobei

X und X^1 jeweils unabhängig voneinander für H oder eine Schutzgruppe stehen;

B für eine Base; und

R für eine Alkyl-, Alkoxyalkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe, die jeweils gegebenenfalls substituiert sein kann, steht;

oder eine Verbindung der Formel (3):



wobei

X und X^1 jeweils unabhängig voneinander für H oder eine Schutzgruppe stehen;

R^1 und R^2 jeweils unabhängig voneinander für H, Alkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Halogen stehen;

und

R für eine Alkyl-, Alkoxyalkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe, die jeweils gegebenenfalls substituiert sein kann, steht;

mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 dargestellt; und

b) die Verbindung der Formel (1) oder der Formel (3) an ein Nukleosid oder Oligonukleotid gekuppelt wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen