

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **227760**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **399630**

(51) Int.Cl.
C07H 21/04 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **22.06.2012**

(54) **Sposób wytwarzania modyfikowanych oligonukleotydów zawierających co najmniej jedno wiązanie fosfodiesterowe, w którym niemostkowy atom tlenu jest zastąpiony atomem siarki**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
23.12.2013 BUP 26/13

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.01.2018 WUP 01/18

(73) Uprawniony z patentu:

**CENTRUM BADAŃ MOLEKULARNYCH
I MAKROMOLEKULARNYCH POLSKIEJ
AKADEMII NAUK, Łódź, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**JANINA BARANIAK, Łódź, PL
RENATA KACZMAREK, Łódź, PL
DARIUSZ KORCZYŃSKI, Łódź, PL
EWA RADZIKOWSKA, Łódź, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Iwona Brodowska

PL 227760 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania modyfikowanych oligonukleotydów zawierających co najmniej jedno wiązanie fosfodiesterowe, w którym niemostrkowy atom tlenu jest zastąpiony atomem siarki o ogólnym wzorze **1**, w którym **Q** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję 5'-hydroksylową lub stały nośnik, **U** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję 3'-hydroksylową lub stały nośnik, **R¹** oznacza atom wodoru lub niepodstawioną resztę alkilową lub aryłową zawierającą od 1 do 7 atomów węgla, **X** oznacza atom siarki a **Y** oznacza atom tlenu, lub **X** oznacza atom tlenu a **Y** oznacza atom siarki, k, l i m oznaczają liczby 0–100, przy czym co najmniej 2 z nich są różne od zera, a poszczególne symbole **B** w łańcuchu oligodeoksyrybonukleotydowym są takie same lub różne i oznaczają resztę adeniny, guaniny, cytozyny o wzorach **2**, **3** **4** w których **R³** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję egzoaminową albo **B** oznacza resztę tyminy o wzorze **5**, przy czym przy poszczególnych tiofosforanowych atomach fosforu są konfiguracje takie same lub różne albo ich mieszanina, z wykorzystaniem mieszanej strategii oksatiafosforanowo-amidofosforynowej.

Syntetyczne oligonukleotydy stanowią ważną grupę potencjalnych terapeutyków stosowanych w leczeniu chorób o podłożu genetycznym jak również wykazują działanie przeciwwirusowe (tzw. strategia antysensowa) [(a) S. Agrawal, *Tibitech.*, 1996, 14, 376; (b) D. E. Szymkowski, *Drug Discovery Today*, 1996, 1, 415]. Jednakże podatność niemodyfikowanych oligonukleotydów (PO-ODNs) na nukleolityczną degradację katalizowaną przez wewnątrzkomórkowe nukleazy, sprawia, że związki te nie mogą być wykorzystywane do tych celów. Rozwiązaniem problemu jest stabilizacja cząsteczki oligonukleotydu poprzez wprowadzenie trzech typów chemicznych modyfikacji: modyfikacje nukleozasady, modyfikacje reszty cukrowej (szczególnie pozycji 2'rybozy) oraz modyfikacje wiązania internukleotydowego [P. D. Cook, *Anti-Cancer Drug Des.*, 1991, 6, 585]. Jako że niniejszy przedmiot wynalazku dotyczy modyfikacji wiązania internukleotydowego toteż poniższe wprowadzenie koncentruje się wyłącznie na tym typie modyfikacji.

Spośród różnorodnych modyfikacji wiązania internukleotydowego najistotniejszą rolę odgrywa zastąpienie jednego z niemostrkowych atomów tlenu w wiązaniu fosfodiesterowym atomem siarki [F. Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.*, 1985, 54, 367]. Otrzymane w ten sposób tiofosforanowe oligonukleotydy (PS-ODNs), stanowią główną grupę tzw antysensowych oligonukleotydów pierwszej generacji.

Chociaż tiofosforanowe oligonukleotydy wykazują wiele pozytywnych cech (odporność na degradację nukleolityczną, aktywowanie RNAzy H, korzystne własności farmakokinetyczne) [(a) J. M. Campbell, T. A. Bacon, and E. Wickstrom, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1990, 20, 259; (b) M. I. Phillips and Y. C. Zhang, *Methods Enzymol.*, 2000, 313, 46–56 (c) S. T. Crooke, *Methods Enzymol.*, 2000, 313, 3]. to niestety, nie są pozbawione działań niepożądanych takich jak niesekwencyjne specyficzne wiązanie z białkami komórkowymi, zależna od stężenia kompetycyjna inhibicja różnych nukleaz i polimeraz [(a) S. T. Crooke *Therapeutic Application of Oligonucleotides* 1995, pp. 63 R. G. Landes Co., Austin, TX; (b) M. A. Guvakova, L. A. Yakubov, I. Vlodavsky, J. L. Tonkinson and C. A. Stein, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 2620; (c) D. A. Brown, S.-H. Kang, S. M. Gryaznov, L. DeDionisio, O. Heidenreich, S. Sullivan, X. Xu and M. I. Neerenberg, *J. Biol. Chem.*, 1994, 43, 26801]. Jakkolwiek powody tego niespecyficznego oddziaływania z białkami są do tej pory niewyjaśnione to mogą one być toksyczne dla komórki. Jednakże, jak wykazały liczne badania, modyfikacja każdego wiązania internukleotydowego w cząsteczce oligonukleotydu nie jest konieczna do podwyższenia jego nukleolitycznej stabilności [(a) J. P. Shaw, K. Kent, J. Bird, J. Fishback and B. Froehler, *NucleicAcids Res.*, 1991, 19, 747; (b) G. D. Hoke, K. Draper, S. M. Freier, C. Gonzalez, V. B. Driver, M. C. Zounes and D. J. Ecker, *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 5743].

Tak zwane chimeryczne oligonukleotydy, które w jednej cząsteczce posiadają zarówno niemodyfikowane fosforanowe jak i tiofosforanowe wiązania internukleotydowe (PO/PS-ODNs) wykazują zwiększone powinowactwo do docelowej sekwencji wybranego mRNA i obniżone powinowactwo do białek. Ponadto PO/PS oligonukleotydy są znacząco bardziej odporne na działanie exo- i endonukleaz w porównaniu z niemodyfikowanymi PO oligonukleotydami [(a) W.-Y. Gao, F.-S. Han, Ch. Storm, W. Egan and Y.-Ch. Cheng, *Mol. Pharmacol.* 1992, 41, 223; (b) M. K. Ghosh, K. Ghosh and J. S. Cohen, *Anti-Cancer Drug Des.*, 1993, 8, 15; (c) H. Soreq, D. Patinkin, E. Lev-Lehman, M. Grifman, D. Ginzberg, F. Eckstein, Zakut, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994, 91, 7907].

Biorąc pod uwagę budowę chemiczną chimeryczne oligonukleotydy można podzielić na dwa typy. Pierwszy z nich posiada wiązania tiofosforanowe w naprzemiennych pozycjach, podczas gdy drugi

zawiera połączone klastery oligofosforanów i tiofosforanów. W tym przypadku zakłada się, że tiofosforanowe fragmenty znajdujące się na końcach będą zapewniały większą nukleolityczną stabilność, podczas gdy centralny niemodyfikowany fragment fosforanowy zwiększa własności hybrydizacyjne „chimerycznej” cząsteczki w porównaniu z PS-ODNs i ułatwia działanie RNAzy H na dupleks wytworzony z docelowym RNA [B. T. Monia, J. F. Johnston, H. Sasmor and L. L. Cummins, *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 14533].

Rozważając biologiczną aktywność tiofosforanowych oligonukleotydów (PS ODNs) należy brać pod uwagę chiralność atomu fosforu, co sprawia, że tiofosforanowe analogi występują w postaci mieszaniny 2^n (liczba chiralnych atomów fosforu) diastereoizomerów, gdyż standardowo PS-ODNs syntetyzowane są przy użyciu niestereoselektywnej metody amidofosforynowej [W.J. Stec, A. Wilk, *Angew. Chem.* 1994, 106, 747; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1994, 33, 709]. Badania dotyczące stereoselektywnej metody syntezy PS-ODNs były prowadzone w licznych laboratoriach i obecnie mogą one być otrzymane w oparciu o jedną z trzech możliwych metod syntezy: metodologię oksatiafosfolanową [(a) W.J. Stec, A. Grajkowski, M. Koziółkiewicz, B. Uznanski *Nucleic Acid Res.* 1991, 19, 5883; (b) P. Guga, A. Okruszek, W.J. Stec *Top. Curr. Chem.* 2002, 220, 169], metodę wykorzystującą jako monomery 3'-O-(3-N-acylo)oksazafosfolidynowe pochodne nukleozydów [A. Wilk, A. Grajkowski, L.R. Phillips, S.L. Beaucage *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 2149] lub stereoselektywne monomery nukleozydowe pochodne 3'-O-oksazafosfolidynowe [N.Oka, T. Wada, K. Saigo *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 8307; N. oka, M. Yamamoto, T. Sato, T. Wada *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 16031].

W literaturze nie opisano dotychczas prób syntezy fosforanowo/tiofosforanowych chimerycznych oligonukleotydów z wykorzystaniem mieszanej strategii oksatiafosfolanowo-amidofosforynowej. Stereozdefiniowane internukleotydowe wiązania tiofosforanowe w cząsteczce oligodeoksyrybonukleotydu w sposób według wynalazku są tworzone w oparciu o metodologię oksatiafosfolanową [(a) W.J. Stec, A. Grajkowski, M. Koziółkiewicz, B. Uznanski *Nucleic Acid Res.* 1991, 19, 5883; (b) P. Guga, A. Okruszek, W.J. Stec *Top. Curr. Chem.* 2002, 220, 169], która jako monomeryczne nukleotydy wykorzystuje poszczególne diastereoizomery odpowiednio blokowanych 3'-O-(2-tio-1,3,2-oksatiafosfolano)nukleozydów. Natomiast fosforanowe segmenty oligonukleotydów są otrzymywane z wykorzystaniem powszechnie stosowanej metodologii amidofosforynowej.

Połączenie tych dwóch metodologii nie było dotychczas możliwe, gdyż odczynnik (mieszanina jod/woda) standardowo stosowany do utlenienia przejściowo tworzącego się fosforynowego wiązania internukleotydowego utlenia również tiofosforanowe wiązanie internukleotydowe utworzone w czasie elongacji łańcucha oligonukleotydowego za pomocą metodologii oksatiafosfolanowej.

Rozwiązanie tego problemu znaleziono stosując sposób według wynalazku, polegający na zastosowaniu specjalnie dobranej odczynnikowej utleniającej, który generuje wiązanie PO i w obecności, którego wiązanie PS pozostaje stabilne.

Sposób wytwarzania fosforanowo/tiofosforanowych oligonukleotydów o ogólnym wzorze **1**, w którym **Q** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję 5'-hydroksylową lub stały nośnik, **U** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję 3'-hydroksylową lub stały nośnik, **R¹** oznacza atom wodoru lub niepodstawioną resztę alkilową lub arylową zawierającą od 1 do 7 atomów węgla, **X** oznacza atom siarki a **Y** oznacza atom tlenu lub **X** oznacza atom tlenu a **Y** oznacza atom siarki, k, l i m oznaczają liczby 0–100, przy czym co najmniej dwie z nich są różne od zera a poszczególne symbole **B** w łańcuchu oligodeoksyrybonukleotydowym są takie same lub różne i oznaczają resztę adeniny, guaniny, cytozyny o wzorach **2**, **3** lub **4**, w których **R³** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję egzoaminową, albo **B** oznacza resztę tyminy o wzorze **5**, przy czym przy poszczególnych tiofosforanowych atomach fosforu są konfiguracje takie same lub różne albo ich mieszanina, według wynalazku polega na tym, że kondensację prowadzi się osadzając na nośniku nukleozyd o wzorze **8a** w którym **Z¹** oznacza grupę blokującą funkcję 5'-hydroksylową, **B** ma wyżej podane znaczenie, a **U** oznacza stały nośnik z przedłużonym łańcuchem i dodaje się kolejno, naprzemiennie w obecności zasadowego katalizatora takiego jak 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en, pochodne nukleotydów o wzorze **6a** w postaci takich samych lub różnych diastereoizomerów lub ich mieszanin, i wobec katalizatora kwasowego takiego jak tetrazol pochodne nukleotydów o wzorze **7a**, przy czym gdy **X** lub **Y** oznacza atom siarki pochodne nukleotydów mają wzór ogólny **6a**, w którym **B** i **Z¹** mają wyżej podane znaczenie a **R⁴**, **R⁵**, **R⁶**, **R⁷** oznaczają atom wodoru, prosty alkil, cykloalkil lub aryl o 1 do 6 atomów węgla, a gdy **X** lub **Y** oznacza atom tlenu, pochodne nukleotydów mają wzór ogólny **7a**, w którym **B** i **Z¹** mają wyżej podane znaczenie, a **R¹** i **R²** oznaczają niepodstawione reszty alkilowe lub arylowe zawierające od 1 do 7 atomów węgla, przy czym po każdym etapie kondensacji z użyciem pochodnej

nukleotydu o wzorze **7a**, w którym **B**, **Z¹**, **R¹**, **R²** mają wyżej podane znaczenie stosuje się odczynnik utleniający wybrany z grupy nadtlenuków i wodoronadtlenków organicznych, zwłaszcza siliowany wodoronadtlenek tert-butyłowy i powtarza się każdy cykl reakcji, aż do wytworzenia oligodeoksyrybonukleotydu o żądanej sekwencji i o żądanych konfiguracjach przy internukleotydowym tiofosforanowym atomie fosforu a po zakończeniu syntezy z otrzymanego produktu, ewentualnie usuwa się grupy blokujące oraz nośnik albo kondensację prowadzi się stosując w pierwszym jej cyklu nukleozyd o wzorze **8b** w którym **Z²** oznacza grupę blokującą funkcję 3'-hydroksylową, **B** ma wyżej podane znaczenie, a **Q** oznacza stały nośnik z przedłużonym łańcuchem i dodaje się kolejno, naprzemiennie w obecności zasadowego katalizatora takiego jak 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en, pochodne nukleotydów o wzorze **6b** w postaci takich samych lub różnych diastereomerów lub ich mieszanin, i wobec katalizatora kwasowego takiego jak tetrazol pochodne nukleotydów o wzorze **7b**, przy czym gdy **X** lub **Y** oznacza atom siarki pochodne nukleotydów mają wzór ogólny **6b**, w którym **B** i **Z²** mają wyżej podane znaczenie a **R⁴**, **R⁵**, **R⁶**, **R⁷** oznaczają atom wodoru, prosty alkil, cykloalkil lub aryl o 1 do 6 atomów węgla, a gdy **X** lub **Y** oznacza atom tlenu, a pochodne nukleotydów mają wzór ogólny **7b** w którym **B** i **Z²** mają wyżej podane znaczenie, a **R¹** i **R²** oznaczają reszty alkilowe lub aryłowe, przy czym po każdym etapie kondensacji z użyciem pochodnej nukleotydu o wzorze **7b**, w którym **Z²**, **B**, **R¹**, **R²** mają wyżej podane znaczenie stosuje się odczynnik utleniający wybrany z grupy nadtlenuków i wodoronadtlenków organicznych, zwłaszcza siliowany wodoronadtlenek tert-butyłowy i powtarza się każdy cykl reakcji, aż do wytworzenia oligodeoksyrybonukleotydu o żądanej sekwencji i o żądanych konfiguracjach przy internukleotydowym tiofosforanowym atomie fosforu a po zakończeniu syntezy z otrzymanego produktu, ewentualnie usuwa się grupy blokujące oraz nośnik.

Równocześnie z odszczepieniem oligodeoksyrybonukleotydu od stałego nośnika usuwa się grupy blokujące funkcję egzoaminową, z wytworzeniem związku o wzorze **1**, w którym **Q**=H, **U**=H, **B** ma wyżej podane znaczenie, **k**, **l**, **m**, mają wyżej podane znaczenie a **R**=H.

Do zabezpieczenia grup 5'-hydroksylowych stosuje się znane grupy blokujące, korzystnie acylową, benzylową, trifenylometylową, trialkilsililową, 4-metoksytrifenylometylową, a zwłaszcza 4,4-dimetoksytrifenylometylową.

Do ochrony grup egzoaminowych stosuje się korzystnie, grupę fenoksyacetylową, izopropoksyacetylową, izobutyrylową, benzoylową, (dialkiloamino)metylenową, (dialkiloamino)etylidenową.

Po każdym cyklu kondensacji usuwa się grupy blokujące funkcję 5'-hydroksylową, aby przyłączyć następny nukleotyd.

Reakcję prowadzi się w bezwodnym rozpuszczalniku organicznym, korzystnie acetonitrylu, chlorku metylenu, N,N-dimetyloformamidzie.

Jako katalizator zasadowy reakcji tworzenia wiązania internukleotydowego stosuje się nienukleofilowe alkoholany, korzystnie tert-butanolan potasowy oraz 1-metyloimidazol, 4-dimetyloamino-pirydyna, 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en.

Jako katalizator kwasowy reakcji tworzenia wiązania internukleotydowego korzystnie stosuje się takie związki jak triazol, tetrazol.

Jako odczynnik utleniający, który generuje internukleotydowe wiązanie fosforanowe (P=O) stosuje się nadtlenuki i wodoronadtlenki organiczne, korzystnie siliowany wodoronadtlenek t-butyłowy (t-butyloperoksytrimetylosilan).

Jak już wspomniano, zastosowanie sposobu według wynalazku zapewnia stereospecyficzność syntezy tiofosforanowych (P=S) segmentów chimerycznego oligodeoksyrybonukleotydu na stałym nośniku.

Poniżej przedstawiono szczególnie korzystny przebieg procedury według wynalazku.

W związku o wzorze **8a**, w którym **B** oznacza resztę adeniny, guaniny, cytozyny o wzorach **2**, **3**, **4**, w których **R³** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję egzoaminową, albo **B** oznacza resztę tyminy o wzorze **5**, **Z¹** oznacza grupę blokującą funkcję 5'-hydroksylową, **U** oznacza stały nośnik z przedłużonym łańcuchem, odblokowuje się grupę 5'-hydroksylową na drodze kwaśnej hydrolizy i poddaje się kondensacji w obecności katalizatora zasadowego takiego jak 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en, ze związkiem o wzorze ogólnym **6a**, w którym **B**, **Z¹** mają wyżej podane znaczenie, a **R⁴**, **R⁵**, **R⁶**, **R⁷** oznaczają atom wodoru, prosty alkil, cykloalkil lub aryl o 1 do 6 atomów węgla, otrzymując związek o wzorze **1**, w którym **B**, **U** mają wyżej podane znaczenie, **Q**=**Z¹**, które ma wyżej podane znaczenie, **R¹** oznacza atom wodoru, **X** oznacza atom siarki, a **k**=0, **l**=0, **m**=1. Następnie odblokowuje się funkcję 5'-hydroksylową przez kwaśną hydrolizę i przyłącza się, w obecności katalizatora zasadowego takiego jak 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en kolejny związek o wzorze **6a**, w którym

B, **Z**¹, **R**⁴, **R**⁵, **R**⁶, **R**⁷ mają wyżej podane znaczenie, powtarzając pierwszy cykl reakcji m-razy, aż do wytworzenia o żądanej sekwencji i o żądanej konfiguracji przy internukleotydowym atomie fosforu oligodeoksyrybonukleotydu o wzorze **1**, w którym **B**, **Q** i **U** mają wyżej podane znaczenie, **R**¹ oznacza atom wodoru, **X** oznacza atom siarki a k=0 i l=0. Następnie przyłącza się w obecności katalizatora kwasowego takiego jak tetrazol związek o wzorze **7a**, w którym **B** ma wyżej podane znaczenie, **Z**¹ jest grupą blokującą, a **R**¹, **R**² oznaczają reszty alkilowe lub aryłowe, po czym do kolumnienki reakcyjnej wprowadza się odczynnik utleniający otrzymując związek o wzorze **1**, w którym **B**, **Q** i **U** mają wyżej podane znaczenie, **X** ma wyżej podane znaczenie, **R**¹ ma wyżej podane znaczenie, **Y** oznacza atom tlenu, m ma wyżej podane znaczenie a k=0, l=1. Następnie odblokowuje się funkcję 5'-hydroksylową przez kwaśną hydrolizę i powtarza się ostatni cykl reakcji l-razy aż do wytworzenia oligodeoksyrybonukleotydu o wzorze **1**, w którym **B**, **Q**, **U**, **R**¹ **X** i **Y** mają wyżej podane znaczenie, a k=0. Następnie po odblokowaniu 5'-hydroksylowej funkcji na drodze kwaśnej hydrolizy w obecności katalizatora zasadowego przyłącza się związek o wzorze **6a**, w którym **B**, **Z**¹, **R**⁴, **R**⁵, **R**⁶, **R**⁷ mają wyżej podane znaczenie, otrzymując związek o wzorze **1**, w którym **B**, **Q**, **U**, **R**¹, **X** i **Y** mają wyżej podane znaczenie, l i m mają wyżej podane znaczenie a k=1. Następnie odblokowuje się funkcję 5'-hydroksylową na drodze kwaśnej hydrolizy i powtarza się ostatni cykl reakcji k-razy aż do wytworzenia o żądanej sekwencji i o żądanej konfiguracji przy internukleotydowym atomie fosforu oligodeoksyrybonukleotydu o wzorze **1**, w którym **B**, **Q**, **U**, **R**¹ **X** i **Y** mają wyżej podane znaczenie, k, l, m mają wyżej podane znaczenie. Odcięcie oligonukleotydu i usunięcie internukleotydowych grup ochronnych zachodzi w środowisku zasadowym i prowadzi do wytworzenia związku o wzorze **1**, w którym **X** i **Y** mają wyżej podane znaczenie, **B** oznacza reszty niechronionych na grupach egzoaminowych nukleozasad takich jak adenina, guanina, cytozyna, tymina, **Q**, **U**, **R**¹ oznaczają atom wodoru.

Wynalazek ilustrują niżej podane przykłady:

Przykład I

Synteza fragmentu o sekwencji T_{PS}T_{PS}T_{PS}T_{PO}T_{PO}T_{PO}T_{PS}T_{PS}T_{OH}

- A. Przez kolumnkę o pojemności 150 µl, zabezpieczonej z dwóch stron filterkami, zawierającą 1 µM 5'-O-(4,4'-dimetoksytryfenylometylo) tymidyny związanej ze stałym nośnikiem, przepuszczono 2 x 5 ml 2% kwasu dichlorooctowego w chlorku metylenu w ciągu 1 min., przemyto 1 ml chlorku metylenu a następnie 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią.
- B. Do tak przygotowanej kolumnienki wprowadzono 150 µl roztworu acetonitrylu zawierającego 20 µM 5'-O-(4,4'-dimetoksytryfenylometylo)-tymidylo-3'-O-(2-tio-1,3,2-oksafosfolanu) (diastereomer mniej mobilny) i 50 µM 1,8-diazabicyklo[5.4.0]-undec-7-enu. Reakcję prowadzono przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią, po czym przez kolumnkę przepuszczono 150 µl roztworu A+B (1:1) w ciągu 1 min [A-12% roztwór bezwodnika octowego w mieszaninie pirydyna-THF (10:8), B-7g DMAP w 100 ml THF]. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią. Następnie wprowadzono 2 x 5 ml 2% kwasu dichlorooctowego w chlorku metylenu, w celu odblokowania funkcji 5'-hydroksylowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią.
- C. Procedurę opisaną w punkcie B powtórzono dwukrotnie.
- D. Następnie do kolumnienki wprowadzono 150 µl roztworu acetonitrylu zawierającego 20 µM 5'-O-(4,4'-dimetoksytryfenylometylo)-tymidylo-3'-O-(O-β-cyanoetylo-N,N-diizopropyl)amidofosforynu i 20 µM tetrazolu. Reakcję prowadzono przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod wysoką próżnią. Następnie przez kolumnkę przepuszczono 150 µl roztworu A+B (1:1) w ciągu 1 min [A-12% roztwór bezwodnika octowego w mieszaninie pirydyna-THF (10:8), B-7 g DMAP w 100 ml THF]. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią. Do tak przygotowanej kolumnienki wprowadzono 150 µl roztworu zawierającego 50 µM siliłowanego wodoronadtlenku tert-butyłowego. Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1), a następnie wprowadzono 2 x 5 µl 2% kwasu dichlorooctowego w chlorku metylenu, w celu odblokowania funkcji

5'-hydroksylowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią.

- E. Procedurę opisaną w punkcie D powtórzono dwukrotnie
- F. Następnie procedurę opisaną w punkcie B powtórzono trzykrotnie
- G. Do kolumnki wprowadzono 150 μ l 10% roztworu piperydyny w CH_3CN , następnie po upływie 1 godz. usunięto roztwór i kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1), po czym w celu odcięcia oligonukleotydu od stałego nośnika zawartość kolumnki przesypało do fiolki zawierającej 1 ml 25% wodnego roztworu amoniaku. Po upływie 1 godz. odfiltrowano roztwór i złoże przemyto amoniakiem, po czym połączone roztwory zatężono pod wysoką próżnią i analizowano za pomocą MALDI-MS [(M-1)m/z 3075; nieobecny pik M-16 co świadczy o braku utlenienia wiązania P=S].

Przykład II

$\text{T}_{\text{PO}}\text{T}_{\text{PO}}\text{T}_{\text{PO}}\text{T}_{\text{PO}}\text{T}_{\text{PO}}\text{d}(\text{A}_{\text{PS}}\text{A}_{\text{PS}}\text{A}_{\text{PS}}\text{A}_{\text{OH}})$

- A. Przez kolumnkę o pojemności 150 μ l, zabezpieczonej z dwóch stron filterkami, zawierającej 1 μ M 5'-O-(4,4'-dimetoksytryfenylometylo)-N⁶-benzoilo-deoksyadenozyny związanej ze stałym nośnikiem, przepuszczono 2 x 5 ml 2% kwasu dichlorooctowego w chlorku metylenu w ciągu 1 min., przemyto 1 ml chlorku metylenu a następnie 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią.
- B. Do tak przygotowanej kolumnki wprowadzono 150 μ l roztworu acetonitrylu zawierającego 20 μ M 5'-O-(4,4'-dimetoksytryfenylometylo)-N⁶-benzoilodeoksyadenozyno-3'-O-(2-tio-1,3,2-oksafosfolanu) (diastereomer mniej mobilny) i 50 μ M 1,8-diazabicyklo[5.4.0]-undec-7-enu. Reakcję prowadzono przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią, po czym przez kolumnkę przepuszczono 150 μ l roztworu A+B (1:1) w ciągu 1 min [A-12% roztwór bezwodnika octowego w mieszaninie pirydyna-THF (10:8), B-7 g DMAP w 100 ml THF]. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią. Następnie wprowadzono 2 x 5 ml 2% kwasu dichlorooctowego w chlorku metylenu, w celu odblokowania funkcji 5-hydroksylowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią.
- C. Procedurę opisaną w punkcie B powtórzono dwukrotnie.
- D. Następnie do kolumnki wprowadzono 150 μ l roztworu acetonitrylu zawierającego 20 μ M 5'-O-(4,4'-dimetoksytryfenylometylo)-tymidylo-3'-O-(O- β -cyanoetylo-N,N-diizopropyl)amido-fosforu 20 μ M tetrazolu. Reakcję prowadzono przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod wysoką próżnią. Następnie przez kolumnkę przepuszczono 150 μ l roztworu A+B (1:1) w ciągu 1 min [A-12% roztwór bezwodnika octowego w mieszaninie pirydyna-THF (10:8), B-7 g DMAP w 100 ml THF]. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią. Do tak przygotowanej kolumnki wprowadzono 150 μ l roztworu zawierającego 50 μ M sililowanego wodoronadtlenku tert-butyłowego. Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1), a następnie wprowadzono 2 x 5 ml 2% kwasu dichlorooctowego w chlorku metylenu, w celu odblokowania funkcji 5'-hydroksylowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią.
- E. Procedurę opisaną w punkcie D powtórzono czterokrotnie
- F. Następnie procedurę opisaną w punkcie B powtórzono trzykrotnie
- G. Do kolumnki wprowadzono 150 μ l 10% roztworu piperydyny w CH_3CN , następnie po upływie 1 godz. usunięto roztwór i kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1), po czym w celu odcięcia oligonukleotydu od stałego nośnika i odblokowania funkcji egzoaminowych zawartość kolumnki przesypało do fiolki zawierającej 1 ml 25% wodnego roztworu amoniaku. Po upływie 24 godz. odfiltrowano roztwór i złoże przemyto amoniakiem, po czym połączone roztwory zatężono pod wysoką próżnią i analizowano za pomocą MALDI-MS [(M-1)m/z 2758.2; nieobecny pik M-16 co świadczy o braku utlenienia wiązania P=S].

Przykład III**d(A_{PO}C_{PS}A_{PO}C_{PS}A_{PO}C_{PS}A_{PO}C_{PS}C_{OH})**

- A. Przez kolumnkę o pojemności 150 µl, zabezpieczonej z dwóch stron filterkami, zawierającą 1 µM 5'-O-(4,4'-dimetoksytryfenylometylo)-N⁴-benzoiodeoksycytidyny związanej ze stałym nośnikiem, przepuszczono 5 ml 2% kwasu dichlorooctowego w chlorku metylenu w ciągu 1 min., przemyto 1 ml chlorku metylenu a następnie 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią.
- B. Do tak przygotowanej kolumnki wprowadzono 150 µl roztworu acetonitrylu zawierającego 20 µM 5'-O-(4,4'-dimetoksytryfenylometylo)-N⁴-benzoiodeoksycytidyno-3'-O-(2-tio-1,3,2-oksafosfolanu) (diastereomer bardziej mobilny) i 50 µM 1,8-diazabicyklo[5.4.0]-undec-7-enu. Reakcję prowadzono przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią, po czym przez kolumnkę przepuszczono 150 µl roztworu A+B (1:1) w ciągu 1 min [A-12% roztwór bezwodnika octowego w mieszaninie pirydyna-THF (10:8), B-7 g DMAP w 100 ml THF]. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią. Następnie wprowadzono 2 x 5 ml 2% kwasu dichlorooctowego w chlorku metylenu, w celu odblokowania funkcji 5'-hydroksylowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią.
- C. Następnie do kolumnki wprowadzono 150 µl roztworu zawierającego 20 µM 5'-O-(4,4'-dimetoksytryfenylometylo)-N⁶-benzoiodeoksyadenozyno-3'-O-(O-β-cyanoetylo-N,N-diizopropyl)amidofosforynu i 20 µM tetrazolu. Reakcję prowadzono przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod wysoką próżnią. Następnie przez kolumnkę przepuszczono 150 µl roztworu A+B (1:1) w ciągu 1 min. [A-12% roztwór bezwodnika octowego w mieszaninie pirydyna-THF (10:8), B-7g DMAP w 100 ml THF]. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią. Do tak przygotowanej kolumnki wprowadzono 150 µl roztworu zawierającego 50 µM siliowanego wodoronadtlenku tert-butyłowego. Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1), a następnie wprowadzono 2 x 5 ml 2% kwasu dichlorooctowego w chlorku metylenu, w celu odblokowania funkcji 5'-hydroksylowej. Kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1) i suszono pod argonem a następnie pod wysoką próżnią.
- D. Powtórzono procedurę opisaną w punkcie B.
- E. Powtórzono procedurę opisaną w punkcie C.
- F. Procedury opisane w punktach B i C powtarzano dwukrotnie.
- G. Do kolumnki wprowadzono 150 µl 1.0% roztworu piperydyny w CH₃CN, następnie po upływie 1 godz. usunięto roztwór i kolumnkę przemyto 8 ml mieszaniny acetonitryl-chlorek metylenu (1:1), po czym w celu odcięcia oligonukleotydu od stałego nośnika i odblokowania funkcji egzoaminowych zawartość kolumnki przesypało do fiolki zawierającej 1 ml 25% wodnego roztworu amoniaku. Po upływie 24 godz. odfiltrowano roztwór i złoże przemyto amoniakiem, po czym połączone roztwory zatężono pod wysoką próżnią i analizowano za pomocą MALDI-MS [(M-1)m/z 2699.1; nieobecny pik M-16 co świadczy o braku utlenienia wiązania P=S].

Sposobem analogicznym do opisanego w przykładach I-III otrzymano następujące fragmenty:

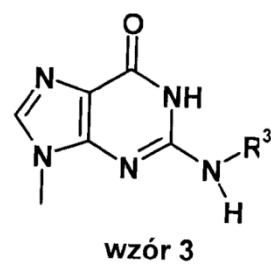
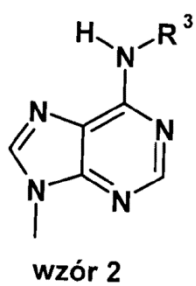
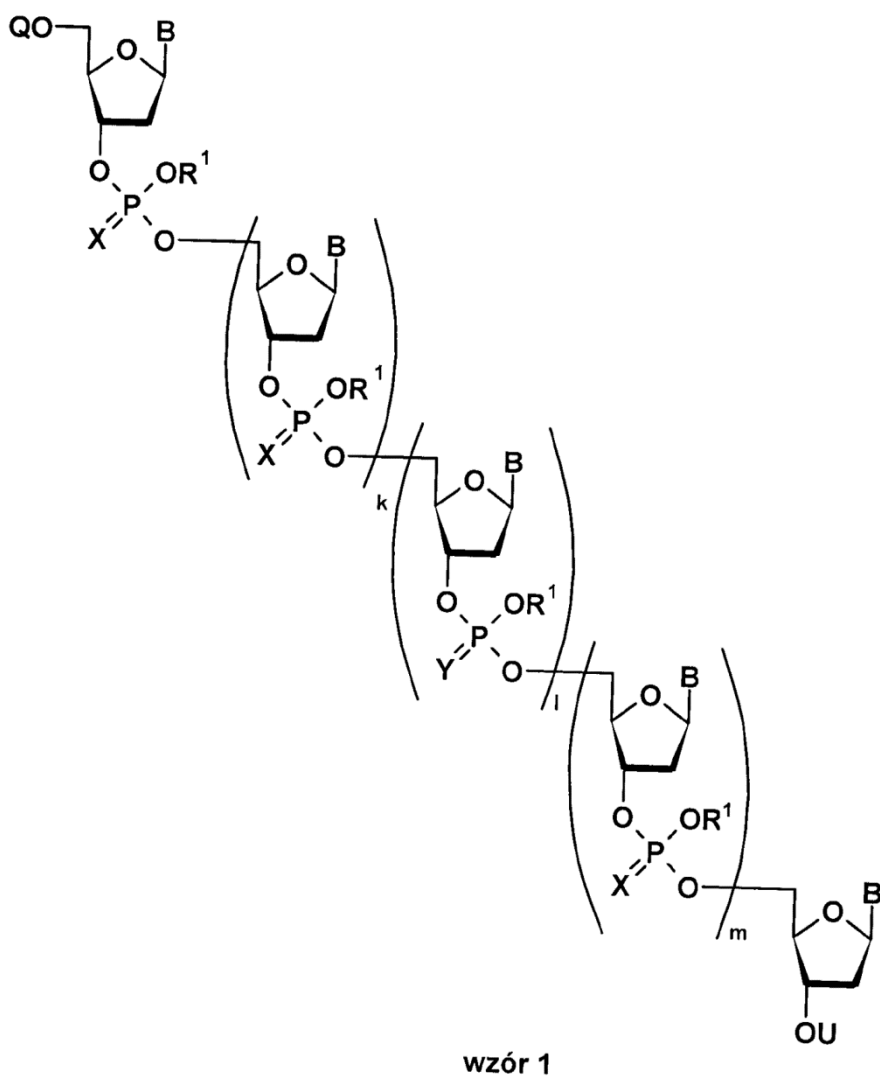
d (G_{PO}G_{PO}A_{PO}A_{PO}A_{PS}A_{OH})**d(G_{PO}G_{PO}A_{PO}A_{PS}A_{PS}A_{OH})****d(A_{PS}A_{PS}A_{PS})T_{PO}T_{PO}T_{PO}T_{PO}T_{PO}d(A_{PS}A_{PS}A_{PS}A_{OH})****T_{PO}T_{PO}T_{PO}T_{PO}T_{PO}d(C_{PS}C_{PS}C_{PS}C_{OH})****d(A_{PS}A_{PS}A_{PS})T_{PO}T_{PO}T_{PO}T_{PO}T_{PO}d (A_{PS}A_{PS}A_{PS}A_{OH})****Zastrzeżenia patentowe**

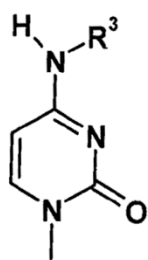
1. Sposób wytwarzania modyfikowanych oligonukleotydów zawierających co najmniej jedno wiązanie fosfodiesterowe, w którym niemostrkowy atom tlenu jest zastąpiony atomem siarki, o ogólnym wzorze **1**, w którym **Q** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję

5'-hydroksylową lub stały nośnik, **U** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję 3'-hydroksylową lub stały nośnik, **R¹** oznacza atom wodoru lub niepodstawioną resztę alkilową lub aryłową zawierającą od 1 do 7 atomów węgla, **X** oznacza atom siarki a **Y** oznacza atom tlenu lub **X** oznacza atom tlenu a **Y** oznacza atom siarki, k, l i m oznacza liczbę 0–100, przy czym co najmniej dwie z nich są różne od zera a poszczególne symbole **B** w łańcuchu oligodeoksyrybonukleotydowym są takie same lub różne i oznaczają resztę adeniny, guaniny, cytozyny o wzorach **2**, **3** lub **4**, w których **R³** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję egzoaminową, albo **B** oznacza resztę tyminy o wzorze **5**, przy czym przy poszczególnych tiofosforanowych atomach fosforu są konfiguracje takie same lub różne albo ich mieszanina, **znamienny tym**, że kondensację prowadzi się osadzając na nośniku nukleozyd o wzorze **8a** w którym **Z¹** oznacza grupę blokującą funkcję 5'-hydroksylową, **B** ma wyżej podane znaczenie, a **U** oznacza stały nośnik z przedłużonym łańcuchem i dodaje się kolejno, naprzemiennie w obecności zasadowego katalizatora takiego jak 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en, pochodne nukleotydów o wzorze **6a** w postaci takich samych lub różnych diastereomerów lub ich mieszanin, i wobec katalizatora kwasowego takiego jak tetrazol pochodne nukleotydów o wzorze **7a**, przy czym gdy **X** lub **Y** oznacza atom siarki pochodne nukleotydów mają wzór ogólny **6a**, w którym **B** i **Z¹** mają wyżej podane znaczenie a **R⁴**, **R⁵**, **R⁶**, **R⁷** oznaczają atom wodoru, prosty alkil, cykloalkil lub aryl o 1 do 6 atomów węgla, a gdy **X** lub **Y** oznacza atom tlenu, pochodne nukleotydów mają wzór ogólny **7a**, w którym **B** i **Z¹** mają wyżej podane znaczenie, a **R¹** i **R²** oznaczają reszty alkilowe lub aryłowe, przy czym po każdym etapie kondensacji z użyciem pochodnej nukleotydu o wzorze **7a**, w którym **B**, **Z¹**, **R¹**, **R²** mają wyżej podane znaczenie stosuje się odczynnik utleniający wybrany z grupy nadtlenków i wodoronadtlenków organicznych, zwłaszcza siliłowany wodoronadtlenek tert-butyłowy (tert-butyloperoksytrimetylosilan) i powtarza się każdy cykl reakcji, aż do wytworzenia oligodeoksyrybonukleotydu o żądanej sekwencji i o żądanych konfiguracjach przy internukleotydowym tiofosforanowym atomie fosforu a po zakończeniu syntezy z otrzymanego produktu, ewentualnie usuwa się grupy blokujące oraz nośnik albo kondensację prowadzi się stosując w pierwszym jej cyklu nukleozyd o wzorze **8b** w którym **Z²** oznacza grupę blokującą funkcję 3'-hydroksylową, **B** ma wyżej podane znaczenie, a **Q** oznacza stały nośnik z przedłużonym łańcuchem i dodaje się kolejno, naprzemiennie w obecności zasadowego katalizatora takiego jak 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en, pochodne nukleotydów o wzorze **6b** w postaci takich samych lub różnych diastereomerów lub ich mieszanin, i wobec katalizatora kwasowego takiego jak tetrazol pochodne nukleotydów o wzorze **7b**, przy czym gdy **X** lub **Y** oznacza atom siarki pochodne nukleotydów mają wzór ogólny **6b**, w którym **B** i **Z²** mają wyżej podane znaczenie a **R⁴**, **R⁵**, **R⁶**, **R⁷** oznaczają atom wodoru, prosty alkil, cykloalkil lub aryl o 1 do 6 atomów węgla, a gdy **X** lub **Y** oznacza atom tlenu, a pochodne nukleotydów mają wzór ogólny **7b** w którym **B** i **Z²** mają wyżej podane znaczenie, a **R¹** i **R²** oznaczają niepodstawione reszty alkilowe lub aryłowe zawierające od 1 do 7 atomów węgla, przy czym po każdym etapie kondensacji z użyciem pochodnej nukleotydu o wzorze **7b**, w którym **Z²**, **B**, **R¹**, **R²** mają wyżej podane znaczenie stosuje się odczynnik utleniający wybrany z grupy nadtlenków i wodoronadtlenków organicznych, zwłaszcza siliłowany wodoronadtlenek tert-butyłowy i powtarza się każdy cykl reakcji, aż do wytworzenia oligodeoksyrybonukleotydu o żądanej sekwencji i o żądanych konfiguracjach przy internukleotydowym tiofosforanowym atomie fosforu a po zakończeniu syntezy z otrzymanego produktu, ewentualnie usuwa się grupy blokujące oraz nośnik.

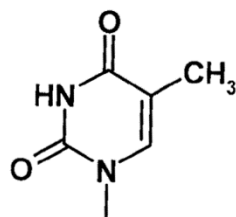
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że po każdym etapie kondensacji z użyciem pochodnej nukleotydu o wzorze **7a**, w którym, **Z¹** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję 5'-hydroksylową, a **R¹**, **R⁴** oznaczają reszty alkilowe lub aryłowe, **B** oznacza resztę adeniny, guaniny, cytozyny o wzorach **2**, **3**, **4**, w których **R³** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję egzoaminową albo **B** oznacza resztę tyminy o wzorze **5**, lub po każdym etapie kondensacji z użyciem pochodnej nukleotydu o wzorze **7b**, w którym **Z²** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję 5'-hydroksylową, a **R¹**, **R²** oznaczają reszty alkilowe lub aryłowe, **B** oznacza resztę adeniny, guaniny, cytozyny o wzorach **2**, **3**, **4**, w których **R³** oznacza atom wodoru lub grupę blokującą funkcję egzoaminową albo **B** oznacza resztę tyminy o wzorze **5** stosuje się odczynnik utleniający z grupy nadtlenków i wodoronadtlenków organicznych, korzystnie siliłowany wodoronadtlenek tert-butyłowy (tert-butyloperoksytrimetylosilan).

Rysunki

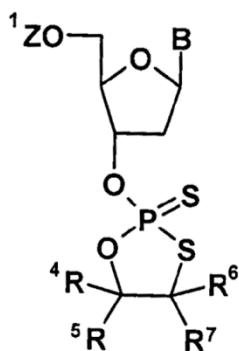




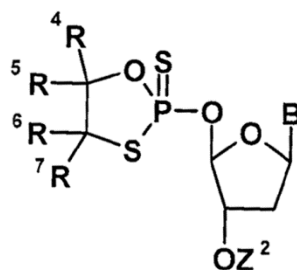
wzór 4



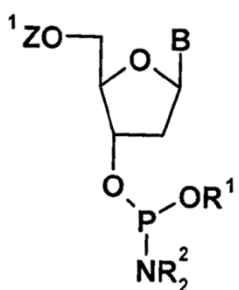
wzór 5



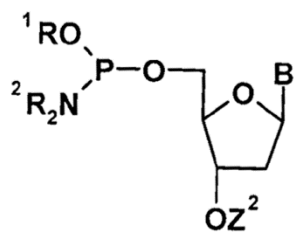
wzór 6a



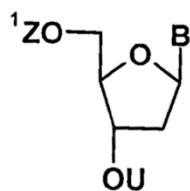
wzór 6b



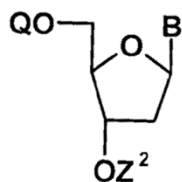
wzór 7a



wzór 7b



wzór 8a



wzór 8b