

P. L. no 85.237

4.

E.I.DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE NUCLEÓTIDOS
DE ALQUINILAMINO"

ÂMBITO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito aos nucleótidos de alquinilamino e especialmente à sua utilização para a preparação de nucleotidos marcados por fluorescência como bases para a terminação de cadeias para um processo de sequenciação de ADN baseado na fluorescência.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A sequenciação de ADN é um dos fundamentos das técnicas analíticas da biologia molecular moderna. O desenvolvimento de processos seguros para a sequenciação conduziu a grandes avanços na compreensão da organização da informação genética e tornou possível a manipulação do material genético (isto é, trata-se da engenharia genética).

Correntemente existem dois processos gerais para a sequenciação de ADN; o processo de degradação química de Maxam-Gilbert [A.M.Maxam e outros., Meth. em Enzym., Vol.65,

L

499-559 (1980)] e o processo de terminação de cadeia de didesoxi de Sager [F. Sanger, e outros., Proc. Nat. Acad.Sci. USA, Vol.74,5463-5467 (1977)]. Um aspecto comum a estas duas técnicas consiste na geração de um conjunto de fragmentos de ADN que se analisam por electroforese. As técnicas diferem nos métodos utilizados para a preparação destes fragmentos.

Com a técnica de Maxam-Gilbert, os fragmentos de ADN preparam-se através da clivagem química da base específica da porção de ADN que se pretende sequenciar. A porção de ADN que se pretende sequenciar é primeiro marcado no terminal 5' com ^{32}P e depois dividida em quatro porções. Submete-se cada porção a um conjunto diferente de tratamentos químicos concebidos para clivar o ADN nas posições adjacentes a uma dada base (ou bases). O resultado consiste em que todos os fragmentos marcados possuam a mesma terminação 5' da porção original de ADN e possuam terminações 3' definidas pelas posições de clivagem. Este tratamento efectua-se em condições que geram fragmentos de ADN que possuem comprimentos convenientes para separação por electroforese em gel.

Com a técnica de Sanger, produzem-se fragmentos de ADN por cópia enzimática parcial (isto é, síntese) da porção de ADN que se pretende sequenciar. Na versão mais comum, a porção de ADN que se pretende sequenciar é inserida, utilizando técnicas normalizadas, num "vector de sequenciação" que consiste numa porção de ADN grande, circular, de cadeia simples tal como o bacteriofago M13. Este converte-se no modelo para o processo de cópia. Junta-se ao modelo uma pequena porção de ADN com a sequenciação complementar à da região do modelo imediatamente a montante do ponto de inserção

L.

para servir como sistema escorvador para a síntese. Na presença dos quatro trifosfatos de desoxi-ribonucleósidos naturais (os dNTP), a polimerase de ADN prolongará o sistema escorvador a partir do terminal 3' para proporcionar uma cópia complementar do modelo na região da inserção. Para se produzir um conjunto completo de fragmentos de sequenciação efectuam-se quatro reacções em paralelo contendo cada uma os quatro dNTP em conjunto com um terminante único de trifosfato de didesoxiribonucleóido (ddNTP), sendo um para cada base. (Adiciona-se dNTP marcado com ^{32}P para proporcionar fragmentos marcados). Se se incorporar um dNTP por polimerase, a extensão da cadeia pode continuar. Se se seleccionar o correspondente ddNTP, a cadeia termina. A proporção entre ddNTP e dNTP ajusta-se para gerar fragmentos de ADN com comprimentos apropriados. Deste modo, cada uma das quatro misturas reaccionais possuirá o mesmo radical didesoxi-nucleosido no terminal 3' e um terminal 5' definido pelo sistema escorvador.

Os termos "terminante", "terminante de cadeia" e "substrato do terminante de cadeia" podem utilizar-se indiferenciadamente para significar um substrato que se pode incorporar no terminal 3' de uma cadeia de ADN ou ANR através de um enzima que duplica os ácidos nucleicos por um processo orientado por um modelo mas, uma vez incorporado, evita posteriores extensões de cadeia. Em contrapartida, os substratos naturais de desoxinucleótido podem considerar-se como "substratos de propagação da cadeia".

Utiliza-se o termo "nucleosido" para significar uma unidade heterocíclica constituída por uma base e um açúcar composta por uma molécula de pirimidina ou de purina (ou os seus

L

derivados) e por uma molécula de um açúcar ribose (ou os seus derivados ou equivalentes funcionais). O termo "nucleótido" utiliza-se para significar quer um nucleósido quer o seu derivado fosforilado.

Tanto no método de Sanger como no de Maxam-Gilbert converte-se a informação da sequência de base, que geralmente não pode ser directamente determinada por métodos físicos, em informação de comprimento de cadeia que é possível ser determinada. Esta determinação pode conseguir-se através da separação electroforética. Em condições extraordinárias (temperatura elevada, presença de ureia, etc,) os pequenos fragmentos de ADN migram como se tivessem bastonetes viscosos. Se se utilizar uma matriz de gel para a electroforese, os fragmentos de ADN serão encurtados nas suas dimensões. A resolução de base única necessária para a sequenciação pode obter-se normalmente para fragmentos de ADN que possuam diversas centenas de bases.

Para se determinar uma sequência completa, os quatro conjuntos de fragmentos produzidos pela metodologia de Maxam-Gilbert ou de Sanger submetem-se a electroforese em quatro quelhas paralelas. Isto implica a resolução espacial dos fragmentos ao longo de todo o comprimento do gel. O modelo dos fragmentos marcados transfere-se normalmente para uma película fotosensível por auto-radiografia (isto é, produz-se uma exposição intercalando o gel e a película durante um certo período de tempo). A película revelada apresenta bandas distribuídas nas quatro quelhas, referidas frequentemente como uma escada de sequenciação. Faz-se a leitura da escada observando visualmente a película (começando a partir dos fragmentos pequenos de movimentação mais rápida) e determinando a

4.

quelha na qual ocorre a banda seguinte para cada degrau da escada. Uma vez que cada quelha está associada com uma dada base (ou com uma combinação de bases no caso Maxam-Gilbert), a progressão linear da ordenação de quelhas transfere-se directamente para uma sequência de base.

Os métodos de Sanger e de Maxam-Gilbert para a sequenciação de ADN são conceptualmente elegantes e eficazes mas são operacionalmente difíceis e consomem muito tempo. A análise destas técnicas mostra que muitos dos problemas advêm da utilização de um informador radioisotópico único. [Um informador pode definir-se como um grupo químico que possui uma característica física ou química que se pode medir facilmente ou detectar com sistemas de detecção ou procedimentos físicos ou químicos apropriados. A facilidade de detecção pode ser proporcionada por características tais como a variação de cor, luminescência, fluorescência ou radioactividade; ou pode ser proporcionada pela capacidade de o informador servir como sítio de identificação de um ligante para formar complexos específicos ligante-ligante, que possuem grupos detectáveis por procedimentos de detecção convencionais (por exemplo, colorimetria, espectrofotometria, fluorometria ou radioactividade). Os complexos ligante-ligante podem apresentar-se sob a forma de proteína-ligante, enzima-substrato, anticorpo-antígeno, carbo-hidrato-lectina, proteína-co-fator, proteína-efector, ácido nucleíco-ácido nucleíco ou ácido nucleíco-complexos de ligante].

A utilização de radioisótopos de vida curta tal como o ^{32}P com actividade específica elevada é problemática quer do ponto de vista logístico quer do ponto de vista da saúde e

L.

da segurança. O semi-período de vida do ^{32}P obriga à antecipação da preparação dos reagentes diversos dias antes da utilização do reagente. Uma vez gerados os fragmentos de sequenciação de ADN marcados com ^{32}P eles têm a tendência para a auto-destruição e devem ser imediatamente submetidos à análise por electroforese. Os geles de electroforese de grandes dimensões necessários para se conseguir uma separação de base única originam grandes volumes de tampão contaminado originando problemas de eliminação de resíduos. A auto-radiografia necessária para a posterior visualização dos fragmentos de ADN, marcados no gel, é um processo lento (são comuns as exposições nocturnas) e acrescenta um tempo considerável à operação global. Finalmente, existem os riscos potenciais contra a saúde associados à utilização de tais radioisótopos potentes.

A utilização de um único informador para analisar a posição das quatro bases provoca uma considerável complexidade operacional no processo global. Os passos químicos/enzimáticos devem efectuar-se em recipientes separados e a análise electroforeética deve efectuar-se em quatro quelhas paralelas. As distorsões induzidas termicamente na mobilidade provocam imagens enviesadas dos fragmentos de ADN marcados (por exemplo, o efeito de favorecimento) o qual por sua vez conduz a dificuldade na comparação das quatro quelhas. Estas distorções limitam com frequência o número de bases que se podem ler num gel único.

Os longos períodos de tempo necessário para a imagem por auto-radiografia, em conjunto com a necessidade de se utilizarem quatro quelhas paralelas, obriga a uma visualização do tipo instantâneo. Uma vez que é necessária a resolução espacial de

diversas bandas, devem utilizar-se geles muito grandes. Isto origina problemas adicionais: os geles grandes são difíceis de manusear e o processamento é lento, adicionando mais tempo ao processo global.

Finalmente, existe um problema associado à interpretação manual. A conversão de uma escada de sequenciação numa sequência de base é um processo intensivo no tempo, um processo com tendência para introduzir erros exigindo a atenção total de um cientista altamente especializado. Têm-se feito numerosas tentativas para automatizar a leitura e existem realmente alguns auxiliares mecânicos, mas o processo para a interpretação de um gel de sequência é ainda muito lento e trabalhoso.

Para contornar estes problemas pensou-se na substituição da auto-radiografia com ^{32}P por um sistema alternativo de detecção do informador não radioisotópico. Um tal sistema de detecção deve ser excepcionalmente sensível para conseguir obter uma sensibilidade comparável à do ^{32}P ; cada banda num gel de sequenciación contém na ordem de 10^{-16} mole de ADN. Um método de detecção que é susceptível de alcançar este nível de sensibilidade é a fluorescência. Os fragmentos de ADN podem ser marcados com uma ou várias marcas fluorescentes (corantes fluorescentes). A excitação com uma fonte de luz apropriada originará uma emissão característica da marca identificando deste modo a banda.

A utilização de marcas fluorescentes, por oposição às marcas radioisotópicas, proporcionará um manuseamento mais fácil do sistema de detecção para esta aplicação particular. Por exemplo, a utilização de quatro marcas fluorescentes diferentes dis-

4.

tinguíveis com base em alguma característica de emissão (por exemplo, a distribuição espectral, o período de vida, a polarização) permitirá associar uma dada marca unicamente com os fragmentos de sequenciação associados com uma dada base. Com esta associação estabelecida, os fragmentos podem combinar-se e fazer-se a sua resolução numa quelha única e a ordenação da base pode ser feita directamente com base na característica de emissão escolhida.

Até ao presente foram descritas duas tentativas de desenvolvimento de um sistema de sequenciação de ADN baseado na fluorescência. O primeiro sistema desenvolvido pelo "California Institute of Technology" está descrito em "L.M.Smith, West German Pat. Appl.# DE 3446635 A1 (1984); L.E.Hood e outros., West German Pat. Appl.# DE 3501306 A1 (1985); L.M.Smith e outros., Nucleic Acids Research, Vol. 13. 2399-2412 (1985); e L.M. Smith e outros., Nature, Vol. 321, 674-679 (1986)". Conceptualmente este sistema contorna os problemas descritos na secção anterior mas os problemas específicos da implementação torna a abordagem de Smith apenas parcialmente bem sucessida. Por exemplo, o grande intervalo de comprimentos de onda dos máximos de emissão dos fragmentos de sequenciação de ADN marcados com fluorescência utilizados neste sistema tornam difícil exercitar os quatro corantes eficientemente com uma única fonte monocromática. Mais importantes ainda são as perturbações diferenciais significativas na mobilidade electroforética resultante dos corantes com cargas livres diferentes tornando difícil ou impossível efectuar uma sequenciação numa quelha única com o conjunto de corantes utilizado neste sistema. Estas dificuldades foram explicitamente referidas por Smith e outros.

Em geral, a metodologia utilizada para a preparação de fragmentos de sequenciação marcados por fluorescência cria dificuldades. Para a sequenciação de Maxam-Gilbert, os oligonucleótidos marcados na posição 5' estão enzimaticamente ligados a fragmentos de ADN de dupla cadeia de "terminação aderente" produzidos por clivagem de restrição. Isto limita o processo à sequenciação de fragmentos produzidos desta maneira. Para a sequenciação de Sanger, utilizam-se oligonucleótidos marcados na posição 5' como sistemas escorvadores. São necessários 4 sistemas escorvadores especiais. Para se utilizar o novo sistema de vectores é necessário desenvolver o complexo processo de sintetização e de purificação de quatro novos sistemas escorvadores marcados com corante. Isto é verdade sempre que é necessário um sistema escorvador especial.

Todavia a utilização de sistemas de escorvadores marcados é inferior em outros aspectos. As reacções de polimerização ainda devem ser efectuadas em recipientes separados. Tal como nos sistemas de sequenciação de Maxam-Gilbert e de Sanger, todos os fragmentos derivados do sistema escorvador marcado deverão ser eficazmente marcados com fluorescência. Deste modo, o diagrama de sequenciação resultante manterá a maior parte dos inconvenientes comuns (por exemplo bandas falsas ou esbatidas, acumulações) que ocorrem quando se interrompe a extensão de uma cadeia enzimática por processos diferentes da incorporação de um terminante de cadeia.

Numa segunda abordagem "W.Ansgorge e outros J.Biochem.Biophys.Methods, Vol. 13, 315-323 (1986)" descreve-se uma técnica de sequenciação de ADN não radioisotópica em que se liga covalentemente uma marca fluorescente única de 5' -tetrametilrodamina

L.

ao terminal 5' de um sistema escorvador oligonucleótido de base 17. Este sistema escorvador é ampliado enzimaticamente em quatro recipientes através da química de sequenciação de didesoxinucleótido normalizada, para se obter uma série de fragmentos de ADN de comprimento variável copiados enzimaticamente. Cada um dos quatro recipientes contem um terminante de cadeia de didesoxinucleótido correspondente a uma das quatro bases de ADN o que permite a ordenação da base terminal a partir da separação electroforética convencional em quatro quelhas de gel. A marca fluorescente 5' -tetra-metil-rodamina é excitada por um feixe de laser de iões de árgon que passam através de toda a largura do gel. Embora este sistema possua a vantagem de utilizar um informador fluorescente em vez de um informador radioactivo, mantêm-se ainda todas as desvantagens associadas à sequenciación convencional e à preparação de sistemas escorvadores marcados.

Até ao presente ninguém criou um sistema de sequenciação de ADN que combine as vantagens da detecção por fluorescência com a marcação de um terminante. Se se puder conceber terminantes de cadeia marcados apropriadamente por fluorescência, os fragmentos de sequenciação marcados serão produzidos apenas quando um terminante de cadeia marcado por for enzimaticamente incorporado num fragmento de sequenciação, eliminando muitos dos inconvenientes associados com outros métodos de marcação. Se cada um dos quatro terminantes de cadeia necessários para a sequência de ADN for ligado covalentemente a um informador diferente fluorescente distinguível, será possível, em princípio, incorporar todos os quatro terminantes durante uma única reacção de extensão dos sistemas escorvador e depois analisar

lisar os fragmentos de sequenciação resultantes numa quelha de gel única. Se tais terminantes de cadeias marcados com fluorescência puderem ser projectados, estes compostos serão provavelmente úteis para outros tipos de marcação enzimática de ácidos nucleícos. Em particular, os análogos dos terminantes de cadeia marcados com fluorescência podem ser projectados para utilização de informadores não fluorescentes diferentes ou para servirem como substratos de propagação da cadeia para enzimas que copiam os ácidos nucleícos por um processo dirigido por um modelo (por exemplo, transcriptase inversa, polimerase ANR ou polimerase ADN). A introdução de um informador no ADN por um processo útil de sequenciação é um dos problemas mais difíceis de marcação de ácido nucleíco. Provavelmente os compostos e/ou estratégias desenvolvidas para a sequenciação de ADN são também aplicáveis a muitos dos outros problemas de marcação.

Para ser útil como substrato de terminação de uma cadeia para a sequenciação de ADN baseada na fluorescência, um substrato deve conter uma marca fluorescente e deve ser aceite por um enzima útil para a sequenciação de ADN. É de prever que os possíveis substratos adequados sejam os derivados ou análogos de nucleótidos que ocorrem naturalmente. Devido à expectativa de uma marca fluorescente e de um nucleótido não se ajustarem no sitio activo de um enzima de cópia ao mesmo tempo, um substrato bem projectado deve possuir a marca fluorescente separada do nucleótido por um grupo de ligação de comprimento suficiente e de geometria apropriada para colocar a marca fluorescente afastada do sítio activo de um enzima. A natureza do grupo de ligação pode variar com a marca e com o enzima utilizados. Por facilidade de síntese e de adaptabilidade às

4.

variações das necessidades da marca e/ou do enzima, é mais conveniente considerar o grupo de ligação constituído por um ligante que se liga ao nucleótido e à marca fluorescente.

No projecto de terminantes de cadeia marcados por fluorescência para a sequenciação de ADN, o ligante deve satisfazer diversas exigências:

- 1) deve ser possível ligar o próprio ligante ou um equivalente funcional às quatro bases encontradas no ADN;
- 2) o ligante não deve impedir que o nucleótido marcado seja utilizado eficazmente como substrato de terminação de uma cadeia para um enzima útil para a sequenciação de ADN;
- 3) o ligante (mais a marca e o espaçador opcional) deve perturbar a electroforese dos oligonucleótidos aos quais está ligado por um processo que seja independente da base a que está ligado;
- 4) a ligação do ligante à base e ao espaçador ou à marca deve ser estereo-selectiva e regio-selectiva para proporcionar um substrato de nucleótido único, bem definido; e
- 5) o ligante deve possuir preferencialmente uma amina primária ou secundária para acoplamento com a marca.

Embora tenham sido descritos cinco tipos diferentes de ligantes de amina para ligar as marcas aos nucleótidos e oligonucleótidos (ver o que se segue), nenhum destes ligantes satisfaz as cinco exigências atrás referidas, para utilização num substrato de terminação de cadeia útil na sequenciação de ADN.

L.

Bergstrom e outros, J. Am. Chem. Soc., Volu
me 98, 1587 (1976), descrevem um processo para ligar cadeias laterais
de acrilato e de alqueno-amino a nucleósídos fazendo o acoplamento ca
talizado por Pd(II) de 5-mercúrio-uridinas a olefinas. Ruth, PCT/US84/
00279, descreve a utilização das cadeias laterais anteriores como
ligantes para a ligação de informadores a oligonucleótidos sintetiza-
dos não enzimaticamente. Langer e outros, Proc. Nat Acad. Sci.USA, Vo
lume 78, 6633 (1981), descrevem a utilização de ligantes de alilamino
para a ligação de informadores aos nucleótidos. As desvantagens des-
tes ligantes englobam a dificuldade de preparação de modo regio-se-
lectivo dos percursos apropriados de nucleótido mercurial, a difi-
culdade de separação da mistura de produtos gerados por algumas des-
tas reacções de acoplamento de nucleótido/olefina e a potencial ins-
tabilidade dos nucleósídos substituídos por vinilo. Klevan e outros,
WO 86/02929 descrevem um método para acoplar ligantes à posição N4
da citidina e à posição N6 da adenosina. A desvantagem deste método
reside em não existir um sítio análogo na uridina e na guanosina para
acoplamento de um ligante.

Outro ligante potencial que pode satisfa-
zer as cinco exigências atrás referidas é um ligante de alquinilami-
no, no qual um terminal da ligação tripla está acoplado ao nucleósido e o outro terminal da ligação tripla está acoplado a um grupo que contem uma amina primária ou secundária. Para garantir a estabilida-
de química a amina não deve estar directamente acoplada à ligação tripla. Já foram descritos alguns métodos para acoplar grupos alqui-
no a nucleósídos (ver a descrição que se segue).

Barr e outros, J. Chem. Soc., Perkins Trans. 1, 1263-1267 (1978), descrevem a síntese de 5-etiniluridina, 2'-desoxi-5-etiniluridina, 5-etinilcitosina, 5-etinilcitidina, 2'-desoxi-etinilcitidina e os α -anómeros dos 2'-desoxi-ribonucleósidos. Os 2'-desoxi-ribonucleósidos preparam-se por construção dos heterociclos, acoplando com um grupo açúcar 2-desoxi tornado funcional, separando as misturas anoméricas e eliminando os grupos de proteção dos açúcares.

Bergstrom e outros, "J. Am. Chem. Soc.", Vol. 100; 1978; p. 8106, descrevem a ligação de alcenos com derivados de 5-mercúrio ou de 5-iodo de nucleósidos de uracilo. Este método fracassou em reacções análogas de alcinos com derivados de nucleósidos de uracilo.

Vicent e outros, "Tetrahedron Letters"; Vol. 22, 1981; p. 945-947 descrevem a síntese de 5-alcinil-2'-desoxi-uridinas por reacção de 0-3',5'-bis-(trimetilsilil)-desoxiuridina com reagentes de alcinil-zinco, na presença de catalisadores de paládio ou de níquel [dicloro-bis-(trifenilfosfina)-paládio (II); dicloro-bis-(benzonitrilo)-paládio (II) ou dicloro-[etileno-(bis-(difenilfosfina))-níquel-(II)]].

Robins e outros, "J. Org. Chem.", Vol. 48; 1983 p. 1854-1862 descrevem um método para o acoplamento de alcinos terminais, HC CR (R representa um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo, fenilo, trialquilsililo, hidroxialquilo ou hidroxialquilo protegido), a nucleósidos de 5-iodo-uracilo e de 5-iodo-1-metil-uracilo (protegidos com os seus ésteres de p-toluílo) na presença de cloreto

4.

de bis-(trifenilfosfina)-paládio (II) e iodeto de cobre (I) em trietilamina quente. Quando se faz reagir 3',5'-di-O-acetyl-5-iodo-2'-desoxi-uridina com hexino,4-(p-toluiloxi)-butino, 4-(tetrahidro-piraniloxi) ou 4-(tritiloxi)-butino, os produtos principais são as furano [2,3-d]-pirimidin-2-onas ciclizadas em vez das alcinil-uridinas desejadas.

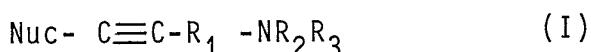
Nenhuma das referências anteriores descreve um método para acoplar um ligante alcinil-amino aos nucleósidos. A metodologia de Bergstrom é deficiente e a de Barr não é aplicável directamente. Os catalisadores utilizados por Robins e outros e por Vicent e outros possuem o potencial para promover diversas reacções secundárias indesejáveis (por exemplo, ciclização ou adição nucleofílica intermolecular da amina a um alcino) quando o alcino contiver um grupo amino. Apenas se descreveram reacções de acoplamento com iodo-nucleósidos que contêm uma base uracilo com falta de electrões. Uma vez que as reacções de acoplamento catalisadas por Pd funcionam geralmente melhor com iodetos de arilo com falta de electrões, podem prever-se os problemas no acoplamento de alcinos a qualquer das outras três bases (as quais são todas mais ricas em electrões do que o uracilo).

Continua a existir carência de nucleótidos de alcinilamino e de processos que permitam a sua preparação.

4.

RESUMO DA INVENÇÃO

Os compostos da presente invenção são nucleótidos de alcinilamino que possuem a estrutura:



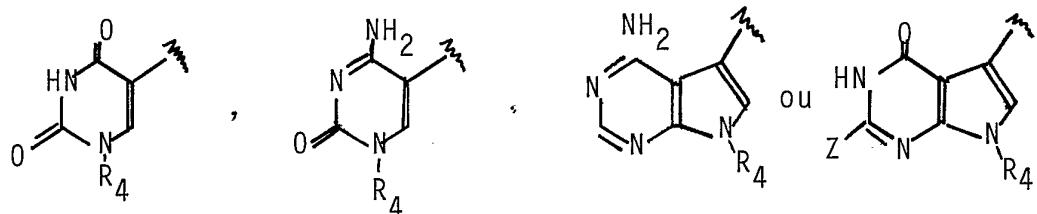
na qual R_1 representa um di-radical substituído ou insubstituído com 1-20 átomos, R_1 pode ser um alcíleno (C_1-C_{20}) de cadeia linear contendo eventualmente na cadeia ligações duplas, ligações triplas, grupos arilo ou heteroátomos tais como átomos de azoto, oxigénio ou enxofre. Os heteroátomos podem fazer parte de grupos funcionais tais como éteres, tioéteres, ésteres, aminas ou amidas. De preferência R_1 representa um grupo alcíleno (C_1-C_{10}) de cadeia linear; mais preferencialmente R_1 representa um grupo $-\text{CH}_2-$.

Os substituintes em R_1 podem englobar átomos de cloro ou grupos alquilo (C_1-C_6), arilo, éster, éter, amina, amida;

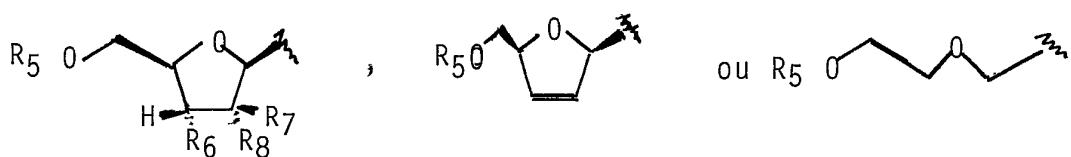
R_2 e R_3 representam, independentemente um do outro, átomos de hidrogénio ou grupos alquilo (C_1-C_4) ou um grupo de protecção tal como acilo, alcoxcarbonilo ou sulfônico. De preferência R_2 representa um átomo de hidrogénio e R_3 representa um átomo de hidrogénio ou um grupo trifluoroacetilo;

Nuc (nucleótilo) representa R_4 -Het (base heterocíclica):

U.



Z representa um átomo de hidrogénio ou um grupo NH_2 ; e
 R_4 representa um açúcar ou um radical semelhante ao açúcar:



e na qual R_5 representa um átomo de hidrogénio ou um grupo PO_3H_2 , $\text{P}_2\text{O}_6\text{H}_3$, $\text{P}_3\text{O}_9\text{H}_4$ ou os seus respectivos sais.

e quando $R_7=R_8=\text{H}$, então $R_6=\text{H}$, OH , F , N_3 ou NH_2 ; ou
quando $R_7=\text{H}$ e $R_8=\text{OH}$, então $R_6=\text{H}$ ou OH ; ou
quando $R_7=\text{OH}$ e $R_8=\text{H}$, então $R_6=\text{OH}$.

Os nucleótidos de alcinilamino marcados da presente invenção têm a estrutura I na qual R_3 representa um informador (marca).

DESCRICAÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A estratégia utilizada para incorporar informadores em fragmentos de sequenciação de ADN segundo o modelo de especificação das bases constitui um aspecto crítico de qualquer sistema de sequenciação de ADN. A utilização dos nucleótidos de alcinil-amino da presente invenção permite uma modificação mais vantajosa da metodologia de Sanger para unir um informador (marca a um terminante de cadeia de nucleótido de alcinilamino. Embora o informador se possa escolher entre uma ampla variedade de grupos facilmente detectáveis (marcas), por conveniência ilustra-se seguidamente a abordagem preferencial utilizando informadores fluorescentes.

Esta abordagem oferece diversas vantagens operacionais. Mais importante ainda, a marcação do terminante associa firmemente o informador ligado com o resultado da terminação específica da base. Apenas os fragmentos de sequenciação de ADN resultantes de casos de terminação genuínos suportarão um informador. Isto elimina muitos dos inconvenientes observados na sequenciação convencional. Esta abordagem também proporciona uma completa flexibilidade na escolha do vector de sequenciação visto que não estão implicados sistemas escorvadores especiais. A automação fica facilitada pelo facto de os informadores serem transportados pelos quatro reagentes de baixo peso molecular que podem ser selectivamente introduzidos numa reacção única.

Não existem desvantagens operacionais in-

L.

rentes; os problemas com esta abordagem surgem ao nível da concepção. Em geral, os enzimas utilizados para a sequenciação de ADN são de substrato altamente selectivo e não existe qualquer razão à priori para esperar que seja susceptível de proporcionar um nucleóside trifosfato com um informador covalentemente ligado que seja um substrato de terminação de cadeia eficiente para uma enzima de sequenciação. Poderia pensar-se que a união de um informador a um substrato originaria variações suficientemente grandes nas características electrónicas e espaciais do substrato de modo a torná-lo inaceitável para a enzima ou, mesmo que fosse aceitável, não seria incorporado na cadeia do ADN. Contudo descobriu-se que a pequena dimensão do ligante de al cinilamino da presente invenção e a capacidade de unir o ligante de alcinilamino à posição 5 dos nucleótidos de pirimidina e à posição 7 dos nucleótidos de purina proporciona substratos de terminação de cadeia marcados que não interferem excessivamente com a qualidade ou a fidelidade da incorporação do substrato.

Far-se-á referência aos nucleótidos de al cinilamino da presente invenção, através da descrição de terminantes de cadeia de nucleótido de alcinilamino marcados por fluorescência. Para esboçar o âmbito estrutural e racional dos nucleótidos de alcinilamino marcados por fluorescência, da presente invenção, é útil decompor a estrutura marcada (I) em cinco componentes:

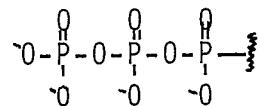
trifosfato-açúcar-Het-C≡CR₁-NR₂- marca (fluorescente)
(i) (ii) (iii) (iv) (v)

L.

- (i) um radical trifosfato, R_5
- (ii) um "açúcar", R_4
- (iii) uma base heterocíclica (Het)
- (iv) um ligante ($-C\equiv CR_1NR_2-$), e
- (v) uma marca fluorescente, R_3 .

(i) Radical trifosfato (R_5)

O radical trifosfato ou um seu análogo perfeito (por exemplo, α -tiotrifosfato) é uma funcionalidade obrigatória para um substrato de enzima ou terminação de cadeia. Esta funcionalidade proporciona a maior parte da energia de ligação para o substrato e é o sítio real para a reacção enzima-substrato.



(ii) Açúcar (R_4)

A porção "açúcar" corresponde ao fragmento estrutural 2'-desoxi-ribofuranose nos substratos de enzimas naturais. Esta porção da molécula contribui para a identificação da enzima e é essencial para manter a relação espacial adequada entre a parte trifosfato e a base heterocíclica. Para ser útil para a sequenciação de ADN, quando o "açúcar" for uma ribofuranose, a posição 3'- α - não deve possuir um grupo hidroxilo suscetível de ser posteriormente utilizado pela enzima. O grupo hidroxilo deve estar ausente, ser substituído por outro grupo ou fazer com que não seja utilizável. Tais açúcares serão

4.

referidos como açúcares de terminação de cadeia. Sabe-se que diversos fragmentos de furanose modificados podem satisfazer esta exigência, nomeadamente:

$\text{2}',\text{3}'\text{-didesoxi-}\beta\text{-D-ribofuranosilo}$ [(a), F.Sanger e outros, Proc. Nat.Acad.Sci.USA, Vol. 74, p. 5463-5467 (1977)].

$\beta\text{-D-arabinofuranosilo}$, [(b) F.Sanger e outros, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 74, p. 5463-5467 (1977)],

$\text{3}'\text{-desoxi-}\beta\text{-D-ribofuranosilo}$ [(c), Klement e outros, gene Analysis Technology, Vol.3, 59-66 (1986)],

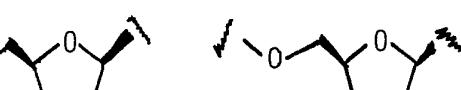
$\text{3}'\text{-amino-2}',\text{3}'\text{-didesoxi-}\beta\text{-D-ribofuranosilo}$ [(d), Z.G.Chidgavadage e outros, Nuc. Acids Res., Vol. 12 1671-1686 (1984)],

$\text{2}',\text{3}'\text{-didesoxi-3}'\text{-fluoro-}\beta\text{-D-ribofuranosilo}$ [(e), Z.G.Chidgavadze e outros, FEBS Lett., Vol. 183, 275-278 (1985)], e

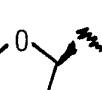
$\text{2}',\text{3}'\text{-didesoxi-2}',\text{3}'\text{-dide-hidro-}\beta\text{-D-ribofuranosilo}$ [(f), Atkinson e outros, Biochem., Vol. 8, 4987-4904 (1969)].



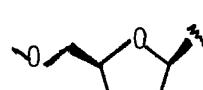
(a)



(b)



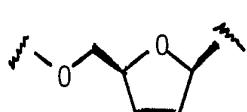
(c)



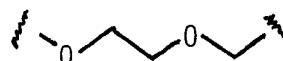
(d)



(e)



(f)



(g)

Os acilonucleóisidos trifosfatos, (AcyNTP), em que a porção designada por açúcar é um grupo acílico [por exemplo, 2-oxietoximetilo, (g)], também podem ser utilizados como terminantes de cadeia na sequenciação de ADN pela metodologia de Sanger. A utilização dos AcyNTP como substratos de terminação de cadeia demonstra-se efectuando a sequenciação convencional de Sanger (informador ^{32}P) com os ddNTP substituídos pelos AcyNTP. As escadas de sequenciação produzidas com os AcyNTP eram virtualmente idênticas às produzidas com os ddNTP, com a excepção de ser necessária uma concentração superior de AcyNTP (aproximadamente 10 x) para se obter uma distribuição semelhante de fragmentos de ADN. Os AcyNTP são eficazes tanto com a polimerase I de ADN (fragmento Klenow) como com a transcriptase inversa de AMV. Por conseguinte admite-se que os derivados de alcinil-amino dos AcyNTP funcionem como substratos de terminação de cadeia.

Os AcyNTP têm a vantagem de se sintetizarem mais facilmente do que os ddNTP. Apesar da síntese dos ddNTP não ser um problema importante na sequenciação convencional, torna-se significativo quando se preparam terminantes de cadeia marcados por fluorescência estruturalmente complexos. A utilização do grupo 2-oxietoximetilo como açúcar, simplifica bastante a síntese do reagente ao mesmo tempo que mantém características de rendimento e qualidade aceitáveis.

A investigação médica identificou outras modificações que podem ser úteis para a sequenciação de ADN. Por exemplo, 3'-azido-2',3'-didesoxi-timidina, [AZT; Mitsuya e outros,

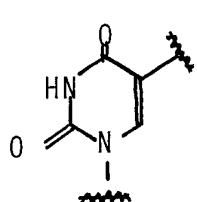
Proc., Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 82, 7096-7100 (1985)] e 9-[2'-hidróxi-1'-(hidroximetil)-etoximetil]-guanina [DHPG; Aston e outros, "Biochem. Biophys. res. Comm"; Vol. 108 (1982) p. 1716-1721] são dois agentes antivirais que se admitem que possam actuar pela sua conversão em trifosfatos que originam a terminação de cadeia da cópia do ADN. Os nucleósidos trifosfato com tais unidades de açúcar também podem ser úteis para a sequenciação de ADN.

(iii) Base heterocíclica (Het).

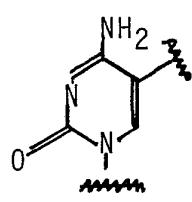
A base heterocíclica funciona como elemento de identificação crítico nos ácidos nucleicos, actuando como um dador e receptor de um átomo de hidrogénio de ligação numa orientação espacial particular. Os elementos de base heterocíclica são essenciais para incorporação com a elevada fiabilidade necessária para a sequenciação exacta. Esta parte estrutural é também o sítio de união do ligante.

As bases heterocíclicas preferenciais englobam: uracilo (h), citosina (i), 7-deaza-adenina (j), 7-deazaguanina (k), e 7-deaza-hipoxantina (l). As 7-aeazapurinas artificiais podem utilizar-se para unir um ligante sem adicionar uma carga livre à porção de base e por isso destabilizando a ligação glicosídica. Além disso, podem utilizar-se outras bases heterocíclicas que sejam funcionalmente equivalentes como receptores e dadores de um átomo de hidrogénio de ligação, por exemplo, podem utilizar-se 8-aza-7-deazapurinas e 3,7-dideaza-adenina em vez das 7-deazapurinas e podem utilizar-se 6 azapirimidinas em vez das pirimidinas. (Para simplificar a nomenclatura, as bases heterocíclicas são designadas e numeradas co-

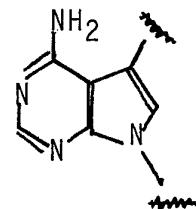
mo 7-deazapurinas em todo o texto).



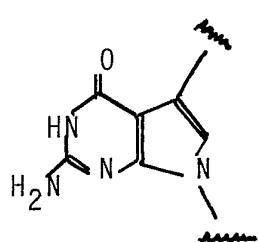
(h)



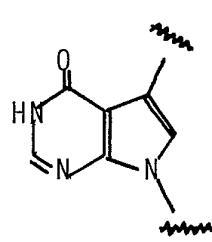
(i)



(j)



(k)



(l)

(iv) Ligante

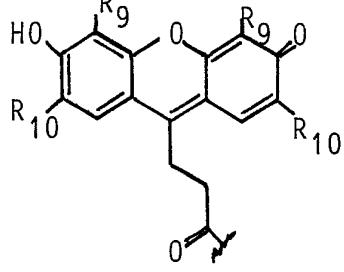
O ligante é um grupo alcinilamino em que um terminal da ligação tripla está ligado a uma amina através de uma parte de di-radical substituído ou insubstituído, R₁, com 1-20 átomos; o outro terminal da ligação tripla está covalentemente ligado à base heterocíclica na posição 5 para as pirimidinas ou na posição 7 (numeração purina) para as 7-deazapurinas. O azoto da amina do grupo alcinilamino está ligado a um grupo funcional reactivo (por exemplo carbonilo) na marca fluorescente. O ligante não deve interferir significativamente com a incorporação ou ligação à polimerase de ADN. A parte di-radical pode ser um alcíleno C₁-C₂₀ de cadeia linear, contendo eventualmente na cadeia ligações duplas, ligações triplas, grupos arilo ou hetero-átomos tais como N, O ou S. Os hetero-átomos podem fazer parte de grupos fun

cionais tais como éteres, tioéteres, ésteres, aminas ou amidas. Os substituintes na parte di-radical podem englobar átomos de cloro ou grupos alquilo C_1-C_6 , arilo, éster, éter, amina, amida. Preferencialmente a parte di-radical é um grupo alquíleno C_1-C_{10} de cadeia linear; mais preferencialmente o di-radical é um grupo $-CH_2-$.

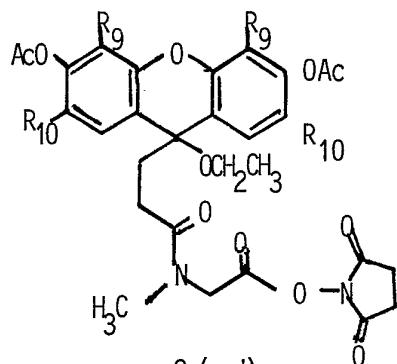
(v) Marca fluorescente (R_3).

A marca fluorescente proporciona a emissão de uma radiação detectável após a excitação por absorção da energia de uma fonte apropriada tal como um laser de iões de árgon. É desejável dispor de informadores fluorescentes únicos que se possam distinguir para cada base de ADN encontrada nas aplicações de sequenciação.

Pode constituir-se uma família de informadores úteis para a marcação com fluorescência num processo de sequenciação de ADN baseada em terminantes de cadeia marcados, a partir do corante conhecido, 9-carboxietil-6-hidroxi-3-oxo-3H-xanteno [S.Biggs e outros., J. Chem. Soc., Vol. 123, 2934.2943 (1923)]. Esta família de xanteno possui a estrutura geral 1.



1 (a-d)



2 (a-d)

na qual R_9 e R_{10} representam um átomo de hidrogénio ou de halogéneo ou um grupo alquilo inferior, alcoxi inferior, ou ciano.

Um conjunto preferencial de corantes de estrutura 1 adequados para a sequenciação de ADN é . a) $R_9=R_{10}= H$,

4

abs. 487 nm, emis. 505 nm; b) $R_9=H$, $R_{10}=CH_3$. abs 494 nm, emis. 512 nm; c) $R_9=CH_3$, $R_{10}=H$, abs. 501 nm, emis. 519 nm; e d) $R_9=R_{10}=CH_3$, abs 508 nm, emis. 526 nm. Os instrumentos descritos por L.M. Smith, L.E. Hood e outros, L. M. Smith e outros e W. Ansorge e outros são susceptíveis de detectar os fragmentos de sequenciação marcados com qualquer destes corantes em concentrações adequadas para a sequenciação de ADN, mas os mesmos instrumentos não são capazes de descriminar entre o anterior conjunto de quatro corantes. No pedido de patente pendente (resumo nº. IP-597-A), aqui mencionado como referência, descreve-se um processo para a descriminação dos corantes e utilização desta informação para determinar as sequências de ADN.

Esse pedido de patente descreve um sistema para fazer a sequenciação de ADN constituído por meios para detectar a presença de energia radiante de informadores intimamente relacionados mas distintos, os quais estão covalentemente ligados a compostos que funcionam como nucleótidos de terminação de cadeia, num processo de Sanger modificado de elongação da cadeia de ADN. Liga-se um informador fluorescente distinguível a cada uma das quatro bases de didesoxi nucleótido representadas nas reacções de Sanger de sequenciação de ADN, isto é, didesoxi nucleótidos de adenina, guanina, citosina e timina. Estes reagentes de terminação de cadeia marcada por informador substituem os terminantes de cadeia não marcada no processo de Sanger tradicional e submetem-se as reacções em que se combinam com os desoxinucleótidos correspondentes, um sistema escorvador apropriado, um modelo e polimerase. A mistura resultante contém

L.

fragmentos de ADN de comprimento variável que diferem uns dos outros por uma base que termina na extremidade 3' com terminantes de cadeia marcada únicos, correspondentes a cada uma das quatro bases de ADN. Este novo processo de marcação permite a eliminação da usual radioactiva contida num dos desoxinucleótidos do processo tradicional de Sanger.

A detecção destas indicações do informador pode efectuar-se com dois tubos estacionários fotomultiplicadores (os TFM) que recebem emissões fluorescentes muito próximas originadas por informadores estimulados com laser e ligados aos terminantes de cadeia dos fragmentos de ADN. Estes fragmentos podem separar-se por electroforese no espaço e/ou no tempo para se moverem ao longo de um eixo perpendicular à área sensora dos TFM. As emissões fluorescentes passam primeiro através de um filtro dicroico que possui simultaneamente uma característica de transmissão e de reflexão, colocado de forma a poder dirigir uma característica (a de transmissão) para um TFM e a outra característica (a de reflexão) para outro TFM. Deste modo, originam-se sinais digitais diferentes em cada TFM podendo calcular-se o cociente da divisão de um pelo outro de modo a proporcionar um terceiro sinal que é único para um dado informador fluorescente, mesmo quando uma série de informadores fluorescentes possuir emissões muito próximas. Este sistema é susceptível de detectar informadores que sejam eficientemente excitados por uma única risca laser, tal como 488 nm e que possuam emissões muito próximas cujos máximos difiram apenas uns dos outros entre 5 e 7 nm. Por conseguinte, as ordenações de base sequencial, num cordão de ADN com interesse, podem fazer-se com base no cociente único calculado a partir de cada um dos quatro ter-

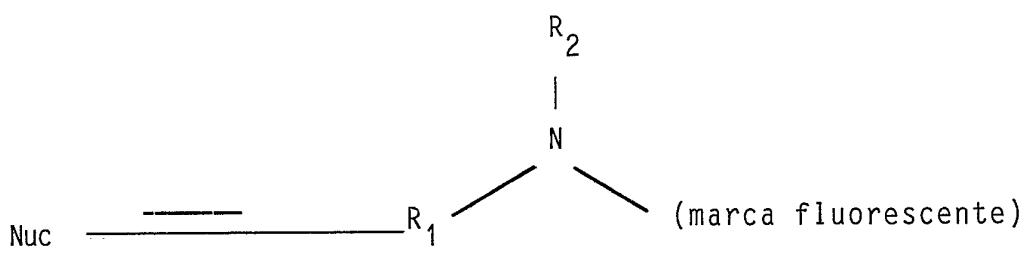
4.

minantes de cadeia marcada com informador a que corresponde cada uma das quatro bases no ADN.

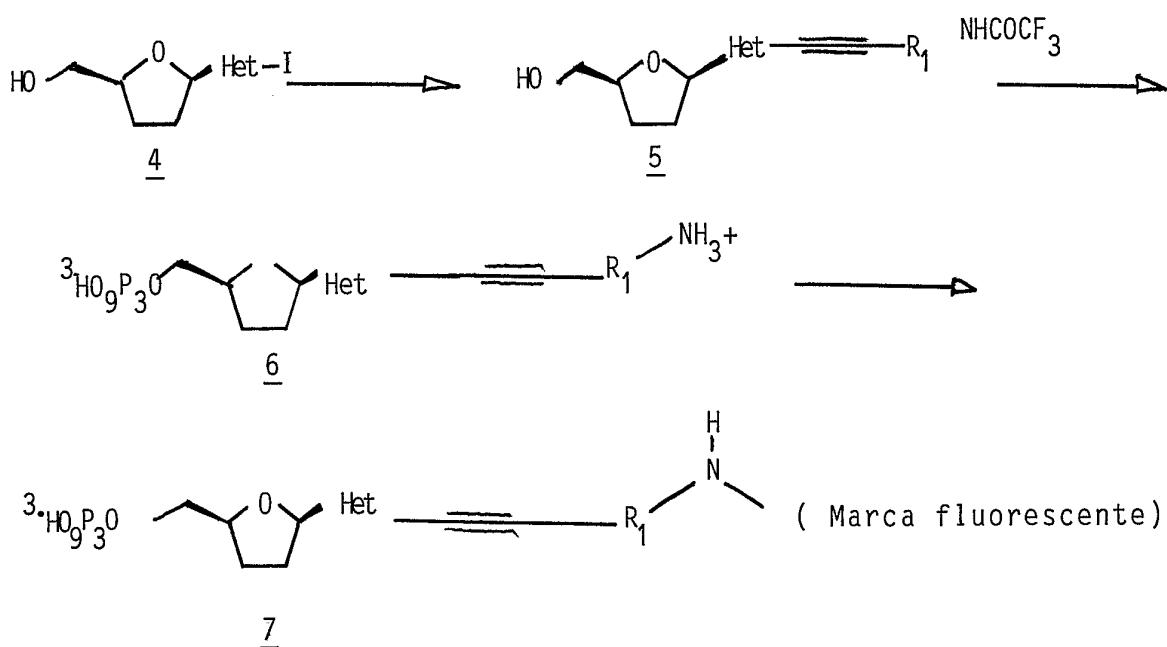
Uma vez que estes corantes de xanteno contêm grupos funcionais reactivos, a patente anterior pendente descreve também o processo de preparação e o projecto de reagentes que são úteis para ligar estes corantes ao grupo amino de um ligante alcinilamino. Os ésteres de N-hidroxisuccinimida 2 (em que R₉ e R₁₀ possuem os significados definidos para a estrutura 1), são exemplos preferenciais de tais reagentes. Durante a preparação de 2 adiciona-se um grupo sarcosina à estrutura do corante básico para minimizar as reacções secundárias. Na patente pendente anterior este grupo opcional de sarcosina aparece referido como um "espaçador". Uma vez que aqui apenas se utilizam os reagentes preferenciais, considera-se que a parte fluorescente de um terminante de cadeia de alcinilamino marcado engloba um espaçador de sarcosina. Depois de o grupo eliminável N-hidroxisuccinimida ter sido deslocado pelo grupo amino do ligante, liberta-se o corante fluorescente (parte da estrutura 1) por tratamento com hidróxido de amónia concentrado. Os ésteres de N-hidroxisuccinimida são agentes de acilação que reagem selectivamente com grupos amino altamente nucleofílicos tais como os que estão presentes nos ligantes de alcinilamino anteriormente descritos. As experiências de controlo demonstram que os ésteres de N-hidroxisuccinimida idênticos a 2 reagem muito mais lentamente com os grupos amino da base heterocíclica do que com o grupo amino ligante. Se a reacção ocorrer de uma forma reduzida com os grupos amino heterocíclicos, verifica-se que as amidas resultantes se podem hidrolisar por tratamento com hidróxido de amónia, libertando o corante. Por conseguinte é possível

utilizar ésteres idênticos a 2 para unir selectivamente qualquer informador tal como um corante fluorescente, ao grupo amino do ligante sem modificar o nucleotídeo de uma maneira indesejável.

Os terminantes de cadeia de nucleotídeo de alcinilamino marcados por fluorescência da presente invenção, funcionam tão bem na sequenciação de ADN com transcriptase inversa AMV como os substratos correspondentes contêm ligantes de alilamino que estão descritos na patente pendente IP-597-A. Todavia, os compostos da presente invenção são mais fáceis de sintetizar do que os substratos correspondentes que contêm ligantes de alilamino, porque os ligantes alcinilamino são mais fáceis de ligar a uma posição previamente seleccionada nas diversas bases necessárias para sequenciação de ADN. Além disso, os ligantes de alcinilamino podem ligar-se aos nucleotídos com um rendimento superior. Finalmente, é previsível que os nucleotídos que contêm um alcino em conjugação com um anel heterocíclico sejam mais estáveis do que os correspondentes nucleotídos que contêm um alceno. Os terminantes de cadeia adequados, marcados por fluorescência derivados de nucleotídos de alcinilamino estão representados pela estrutura 3, em que Nuc, R₁-R₄ e R₆-R₈ têm os significados anteriores, R₅=HO₉P₃⁻³ e com a condição de, quando R₈ for H ou OH, R₆ não poder ser OH.



O esquema 1 descreve os métodos para a preparação dos nucleótidos de alcinilamino da presente invenção em que o açúcar é um grupo 2,3-didesoxi-ribofuranosilo. Estes métodos são compatíveis com todos os açúcares da presente invenção. Quando combinados com métodos conhecidos para a modificação dos açúcares dos nucleótidos, estes métodos podem ser utilizados para a preparação de nucleótidos de alcinilamino em que o grupo 2,3-didesoxi-ribofuranosilo é substituído por outros açúcares da invenção.



ESQUEMA 1

Podem utilizar-se diversas vias para a preparação dos primeiros intermediários fundamentais, os iodonucleósidos (4). (Em alguns casos podem utilizar-se os correspondentes bromonucleosídos em vez dos iodonucleosídos).

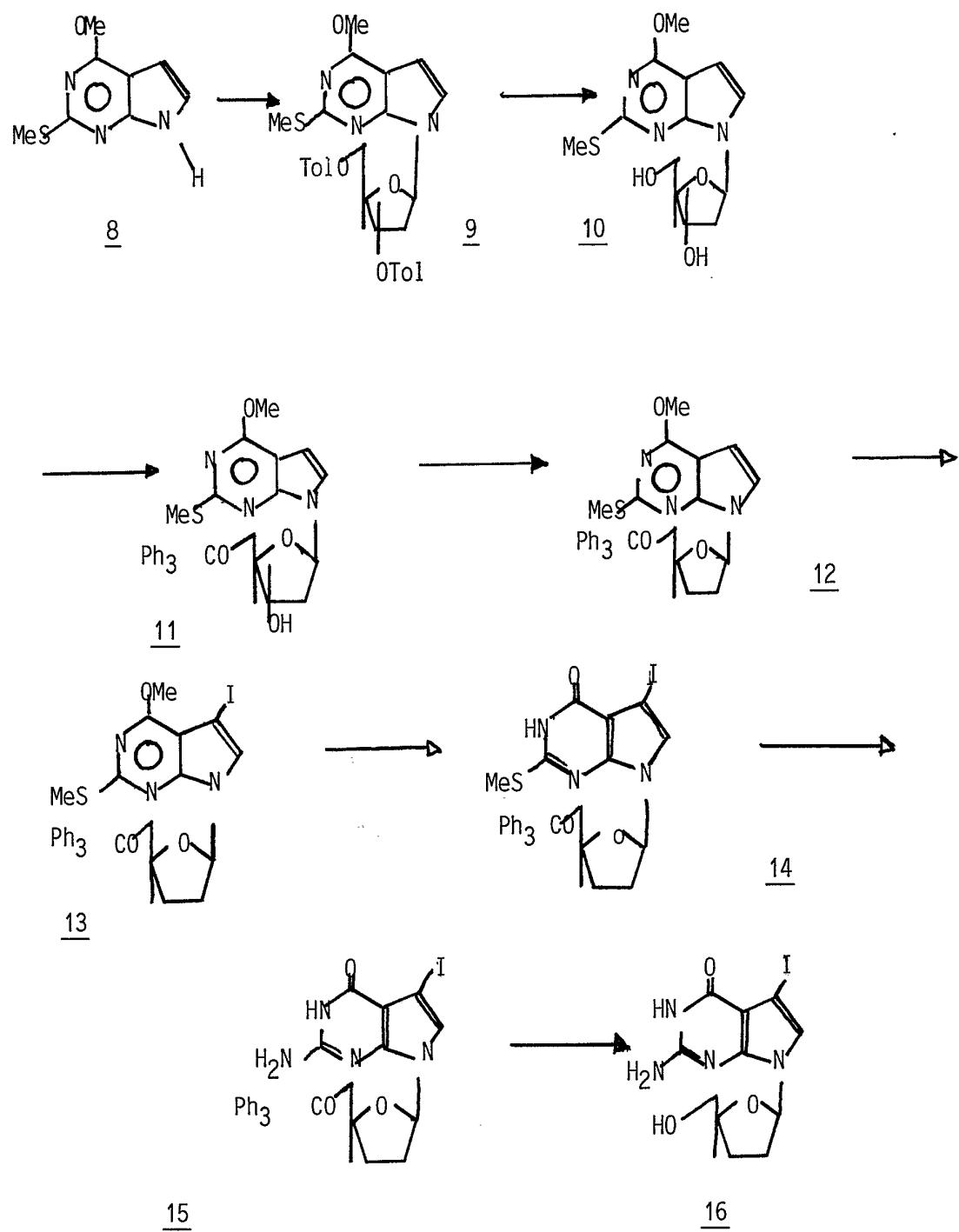
5-iodo-2',3'-didesoxi-uridina pode preparar-se tratando 2',3'-didesoxi-uridina [Pfizer e outros, "J.Org.

Chem"; Vol.29; (1964)] com ICL [Robins e outros, "Can.J.Chem"; Vol. 60 (1982) p. 554-557].

5-iodo-2',3'-didesoxi-citidina pode preparar-se convertendo 2',3'-didesoxi-citidina (Rayco Co.) no correspondente nucleosido de 5-mercúrio [bergstrom e outros, "J.Carbohydrates, Nucleosides and Nucleotides", Vol.4; 257 269 (1977)] e tratando depois o iodo.

Embora sejam conhecidos os métodos para a preparação de 7-deazaguanosina e de 2'-desoxi-7-deazaguanosina, demonstrou-se [Seela e outros, "Chem. Ber"; Vol. III (1978) 2925-2930] que o ataque electrofílico às 7-deazaguaninas ocorre simultaneamente nas posições 7 e 8. Contudo, descobriu-se agora que as 7-iodo-7-deazapurinas desejadas se podem obter por tratamento das 6-metoxi-2-tiometil-7-deazapurinas com N-iodo-succinimida seguido pela substituição dos substituintes 2-tiometilo e 6-metoxi conforme indicado no esquema 2 e descrito no exemplo 3. A utilização de N-iodosuccinimida para a iodação régio-selectiva de um sistema de anel de 7-deazapurina não tem precedentes.

ESQUEMA 2

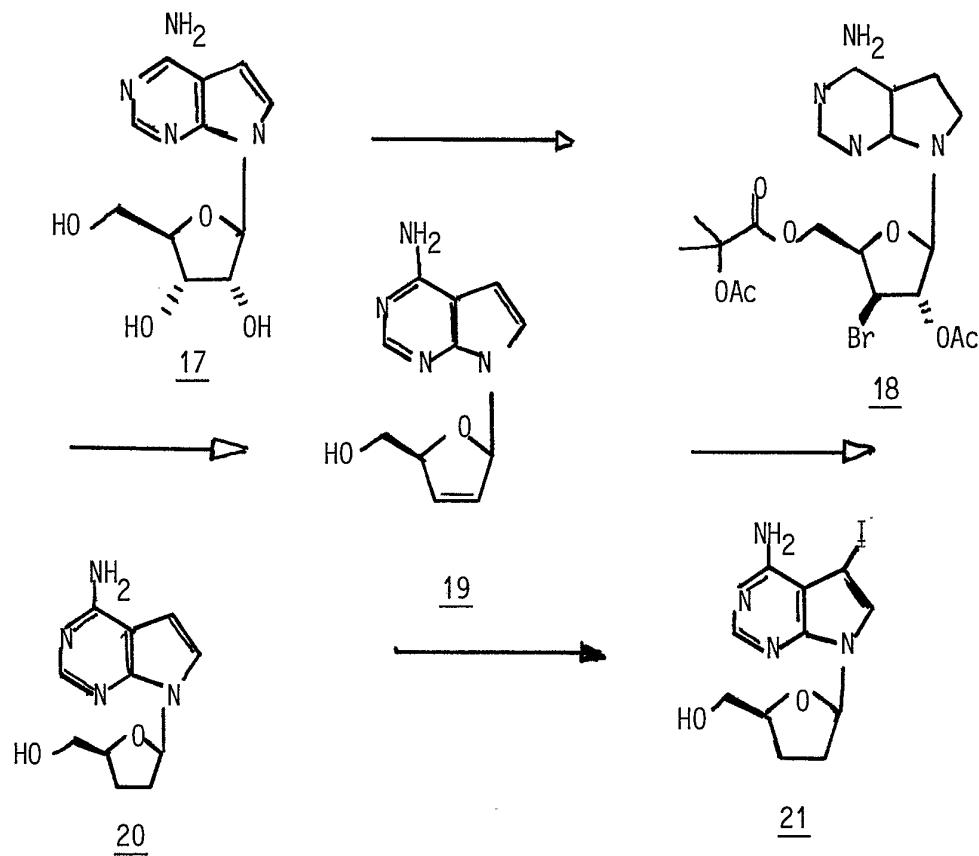


Pode preparar-se 7-iodo-2',3'-didesoxi-7-deaza-adenosina por desoxigenação da tubercidina, seguida do tratamento com mercuriação/iodação (esquema 3). As reacções de desoxigenação adaptaram-se a partir de procedimentos descritos por Moffatt e outros., [J.Am. Chem. Soc., Vol. 95 4016-4030 (1972)] e Robins e outros., [Tetrahedron Lett., Vol. 25. 367-340 (1984)], para se obter uma síntese melhorada de 2',3'-didesoxi-7-deaza-adenosina conforme se indica no esquema 3 e se descreve no exemplo 4.

D

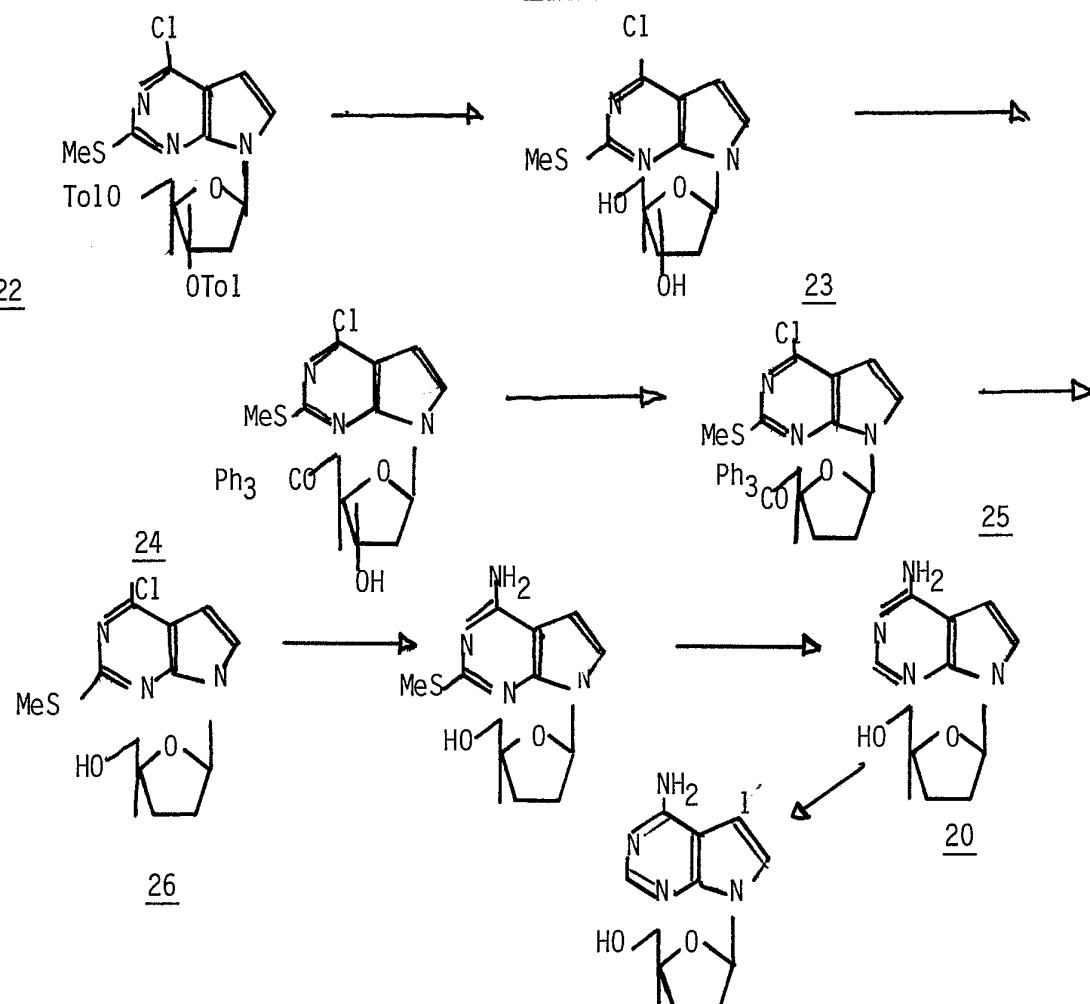
Pode preparar-se 7-iodo-7-deaza-adenosina por tratamento régio-selectivo com mercúrio/iodo da tubercidina (7-deaza-adenosina), conforme referido por Bergstrom e outros, J. Carbohydrates. Nucleosides and Nucleotides, Vol. 5, 285-296 (1978) e Bergstrom e outros., J. Org. Chem., Vol., 46 1424 (1981).

ESQUEMA 3

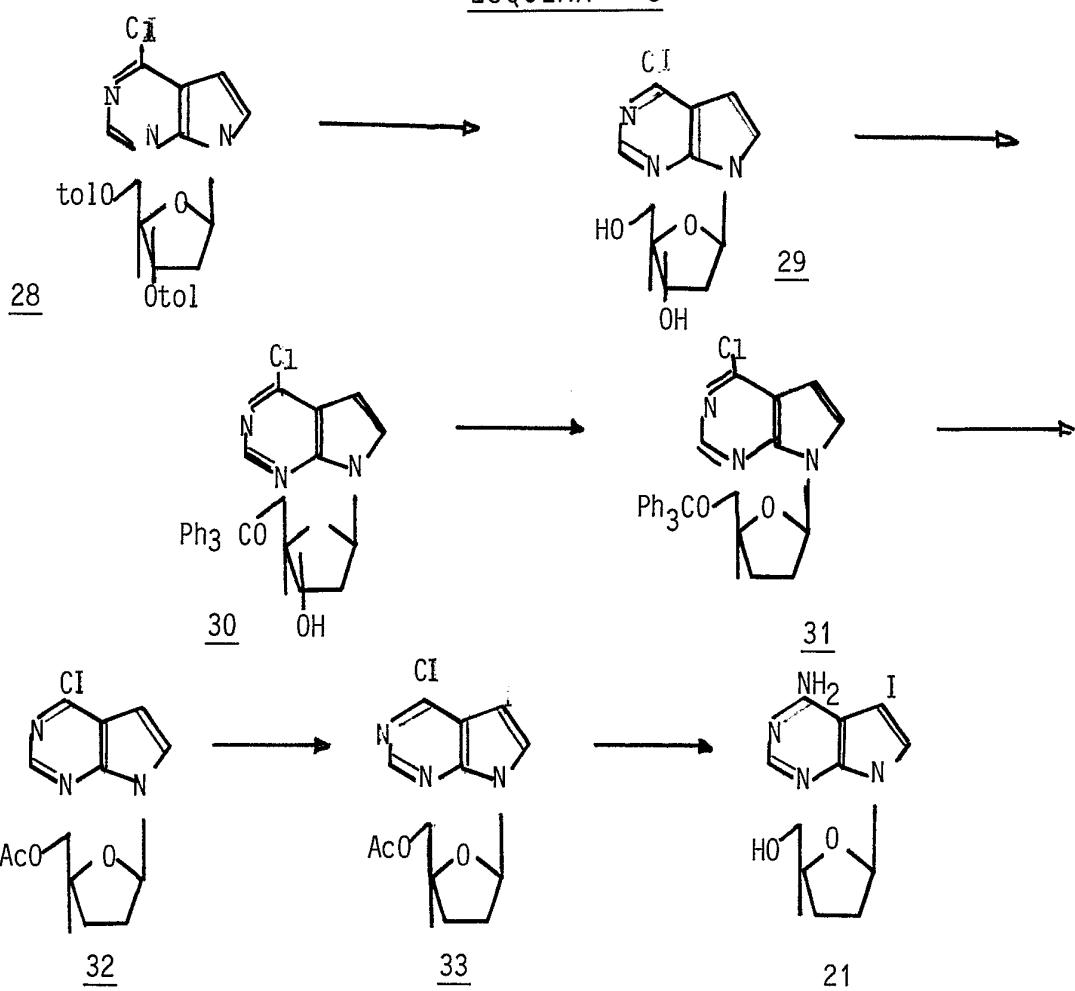


Podem utilizar-se vias alternativas para a preparação de 7-iodo-2'.3'-didesoxi-7-deaza-adenosina que não utilizam como material de partida a tubercidina que é um produto de fermentação bastante dispendioso. Estas vias apresentam-se nos esquemas 4 e 5 e descrevem-se nos exemplos 5 e 6. Numa destas vias, o problema da introdução régio-selectiva de iodo na posição 7 resolveu-se por outro processo de iodação sem precedentes. Neste caso, o tratamento de 6-cloro-deazapurina 32 com monocloreto de iodo, proporcionou apenas o régio-isómero de 7-iodo 33.

ESQUEMA 4



ESQUEMA 5



Embora tenha sido feita a descrição de um método de acoplamento de alcinos terminais com nucleósidos de 5-iodo uracilo protegidos, utilizando um catalisador Pd(II)/Cu(I), por Robins e outros, ["Tetrahedron lett"., Vol.22, (1981) p.421-424], este método não efectua o acoplamento desejado entre as alcinil-aminas (por exemplo, propargilamina) e os nucleósidos de 5-iodo-pirimidina ou de 7-iodo-purina desprotegidos. A capacidade para utilizar alcinilaminas no acoplamento directo foi altamente conveniente para proporcionar directamente compostos com um grupo amina para posterior ligação da marca fluorescente de modo semelhante, investigou-se um método que utiliza nucleósidos desprotegidos para proporcionar uma vida mais di-

recta para os compostos desejados, eliminando as sequências desnecessárias de reacções de protecção/desprotecção.

Nas condições a seguir descritas, foi possível fazer com sucesso o acoplamento das alcinilaminas a uma diversidade de halogeno-nucleósidos com rendimentos excelentes utilizando um catalisador de Pd(0)/Cu(I). Esta reacção de acoplamento também foi bem sucedida quando um azoto de alcinilamina estava protegido por um grupo acilo tal como o acetilo e o trifluoroacetilo, por um grupo alcoxcarbonilo tal como o grupo 9-fluoro-fenil-metloxcarbonilo e por um grupo sulfônico tal como o grupo p-tolueno-sulfônico. Inesperadamente descobriu-se que o número de átomos de carbono entre o grupo amino e a ligação tripla não é crítico no procedimento descrito a seguir:

na reacção de acoplamento utilizou-se com sucesso 3-amino-1-propino (propargilamina), 5-amino-1-pentino, N,(2-propinil)-trifluoroacetamida, N-4(4-pentinil)-trifluoroacetamida e N-(11-dodecinil)-trifluoroacetamida.

O amplo sucesso desta reacção de acoplamento catalisada por Pd(0)/Cu(I) é inesperado face aos conhecimentos da especialidade. Por exemplo, Bergstrom e outros ["J. Am. Chem. Soc." ; Vol. 100 (1978) p. 8106] observaram que os alcinos não se acoplam aos derivados de 5 mercúrio ou de 5-iodo dos nucleósidos de uracilo utilizando catalisadores de Pd. Do mesmo modo, Robins e outros ["J. Org. Chem." ; Vol. 48 (1983) p. 1854-1862] descrevem que as reacções de 3',5'-di-0-acetil-5-iodo-2'-desoxi-uridina catalisadas por Pd(II)/Cu(I) produzem frequentemente produtos ciclizados. Quando se utiliza

4.

o processo que se descreve a seguir, o acoplamento é feito com sucesso mesmo com as alcinilaminas (tais como 5-amino-1-pentino) que possuem o potencial de ciclizar facilmente.

Normalmente, os nucleósidos de alcinilamino da presente invenção podem preparar-se colocando o halogeno-nucleo sido e o Cu(I) num balão, limpando com Ar para remover o ar, adicionando dimetilformamida seca, seguindo-se a adição da alcinilamina, trietilamina e Pd(0). A mistura reacional pode agitar-se durante diversas horas ou até que a cromatografia em camada fina(CCF) indique o consumo do halogeno-nucleóido. Quando se utiliza uma alcinilamina desprotegida, pode isolar-se o nucleosido de alcinilamino concentrando a mistura reacional e fazendo a cromatografia em gel de sílica utilizando um dissolvente de eluição que contenha hidróxido de amónia para neutralizar o hidrohalogeneto gerado na reacção de acoplamento. Quando se utiliza uma alcinilamina protegida, pode adicionar-se metanol/cloreto de metíleno à mistura reacional, seguindo-se a adição de um composto sob a forma de bicarbonato de uma resina de permuta de aniões fortemente alcalina. A massa obtida pode agitar-se durante 45 minutos, filtrar-se e pode lavar-se a resina com metanol/cloreto de metíleno adicional. Os filtrados combinados podem concentrar-se e purificar-se facilmente por cromatografia intermitente em gel de sílica, utilizando um gradiente de metanol/cloreto de metíleno.

Os nucleotidos de alcinilamino da presente invenção preparam-se preferencialmente a partir de nucleosidos de 5-iodopirimidina ou de 7-iodo-7-deazapurina, mas também se podem utilizar os bromo-nucleosidos análogos. [também se pode efectuar uma re-

4.

acção de acoplamento catalisados por Pd(0)/Cu(I) para introduzir grupos alcinilamina noutras posições do anel aromático ou hetero-aromático, na condição de apenas estar disponível o halogeno-nucleótido apropriado].

As alcinilaminas adequadas para a reacção de acoplamento catalisada por Pd(0)/Cu(I) são os alcinos terminais em que a ligação tripla está ligada a uma amina por uma porção di-radical de 1-20 átomos. A porção di-radical pode ser alquíleno C_1-C_{20} de cadeia linear, por exemplo $-C_3-H_6-$, ou pode conter ligações duplas (por exemplo, como no caso $-CH=CHCH_2-$), ligações triplas (por exemplo, como no caso $-C=C-CH_2-$) ou grupos arilo [por exemplo, (para)- $-C_6H_4-$, ou para $CH_2-C_6H_3-$]. O di-radical também pode conter na cadeia hetero-átomos tais como N,O, ou S, como parte dos grupos éter, éster, amina ou amido. Os substituintes adequados na porção di-radical podem englobar átomos de cloro ou grupos alquilo C_1-C_6 , arilo, éster, éter, amina ou amida. De preferência o di-radical é um alquíleno C_1-C_{10} de cadeia linear; mais preferencialmente, o di-radical é um grupo $-CH_2-$. Os substituintes adequados na amina são os grupos alquilo(C_1-C_4) inferior e os grupos de protecção tais como trifluoroacetilo. Em geral, a amina da alcinilamina pode ser primária, secundária ou terciária. Contudo, para se utilizar como ligante, a alcinilamina preferencial é uma amina primária. A amina da alcinilamina é normalmente protegida porque no passo seguinte é necessária a protecção da amina. O produto acoplado purifica-se mais facilmente quando se introduz a amina na forma protegida. Prefere-se um grupo de protecção trifluoro-acetilo por ser mais fácil de eliminar após a conversão do produto de acopla-

mento no 5'-trifosfato correspondente. Geralmente, pode utilizar-se um excesso 1,5-3,0 vezes superior de alcinilamina (em relação ao iodo-nucleósido) para garantir a conversão completa do iodo-nucleosido em nucleosido de alcinil-amino.

Os dissolventes adequados para a reacção de acoplamento englobam os dissolventes polares que dissolvam o iodo-ou o bromo-nucleosido e não decompõem o sistema catalisador Pd(0)/Cu(I). Também se pode utilizar N,N-dimetil-formamida (DMF), acetoni-trilo, THF, dimetilsulfóxido (DMSO), hexametilfosforamida (HMPA) e ál-coois; os solventes que contêm pequenas quantidades de água também são aceitáveis. Preferencialmente o dissolvente é o DMF. De preferênci-a, a concentração do halogeno-nucleosido é 0,02-1,0 M, e mais pre-ferencialmente 0,2-0,5 M.

Os catalisadores de Pd adequados são os complexos de Pd(0), por exemplo, tetraquis-(triarilfosfina)-Pd(0). De preferência o catalisador de Pd(0) é tetraquis-(trifenil-fosfina)-Pd(0). A quantidade de catalisador de Pd é geralmente de 1-25 mol % (com base no iodo-nucleósido), e preferencialmente 5-15 mol%. Utilizam-se quantidades superiores de catalisadores para efectuar a reacção em muita pequena escala ou para diminuir o tempo de reacção de aco-plamento.

De preferência o co-catalisador de Cu(I) é um halogeneto de cobre ou um pseudo-halogeneto (tal como o cianeto de cobre) e mais preferencialmente CuI.

A proporção molar entre o co-catalisador Cu(I) e o catalisador Pd(0) é superior a 1,0 mas inferior a 20. Quan-

do se utiliza uma alcinilamina protegida a proporção molar preferencial entre Cu/Pd é de 2. Quando a alcinil-amina é desprotegida, o átomo de azoto básico não retardado diminui a actividade catalítica do cobre. Neste caso é preferível uma proporção Cu/Pd de 5. Em qualquer dos casos, não se observa reacção à temperatura ambiente quando Cu/Pd = 1. A velocidade de reacção geralmente aumenta quando aumenta também a proporção Cu/Pd. Todavia, com alcinil-aminas protegidas e proporções Cu/Pd superiores a 2 este aumento é acompanhado pela produção crescente de produtos secundários conforme se verifica por CCF.

Nesta reacção a trietilamina serve provavelmente como um purificador de ácido; também se podem utilizar outras aminas fortemente alcalinas. O excesso de alcinilamina desprotegida também pode servir como purificador de ácido, mas também se usa preferencialmente trietilamina.

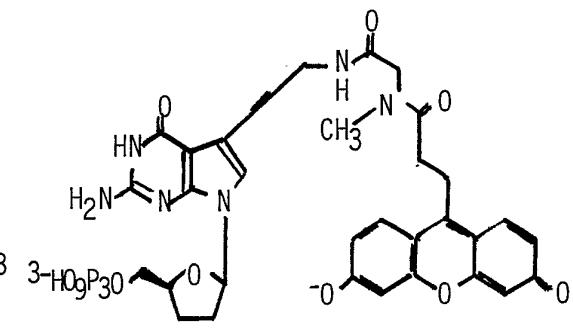
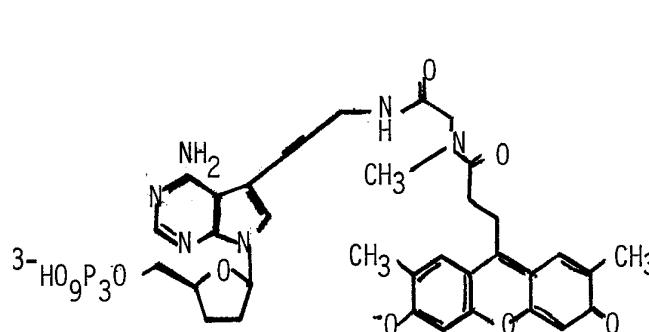
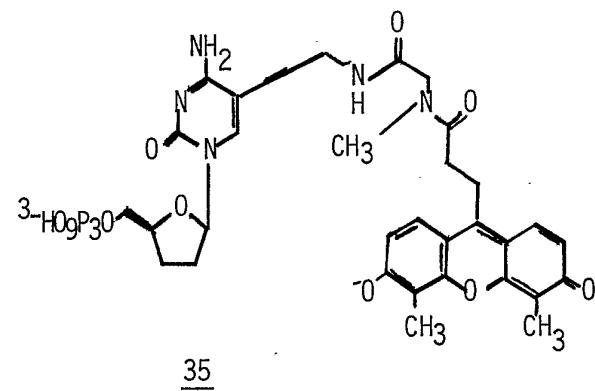
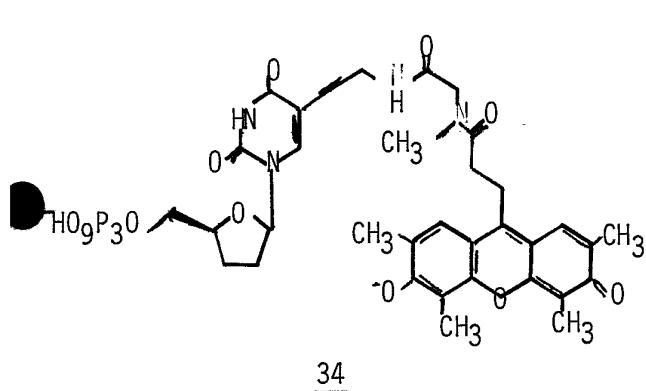
Os nucleóisidos de alcinilamino protegido podem converter-se nos correspondentes 5'-trifosfatos por tratamento com oxicloreto de fósforo e depois em pirofosfato de tri-n-butilamônio [Ruth e outros, "Mol. Pharmacol.".; 415 (1981)]. O trifosfato bruto resultante pode purificar-se neste estádio por cromatografia de permuta de iões fazendo a eluição com um tampão volátil tal como o bicarbonato de trietilamónia. O desejado nucleóido-trifosfato separa-se bem dos produtos secundários, mas a liofilização provoca a eliminação do grupo de protecção do átomo de azoto ligante quando esse grupo de protecção for um grupo trifluoroacetilo. Pode completar-se a desprotecção por tratamento com amónia aquosa a 14% e pode purificar-se novamente o produto por cromatografia de permuta de iões.

4

Dada a natureza do ligante e uma vez que o seu grupo de protecção não bloqueia a conversão em trifosfato, pode utilizar-se esta metodologia para a preparação de uma grande diversidade de nucleóisidos mono-, di- , e trifosfatos com ligantes de alcinilamino protegido ou desprotegido.

Após a preparação dos nucleótidos de alcinil-amino da presente invenção, pode passar-se à fase seguinte de produção de qualquer nucleótido de alcinilamino marcado com um informador da presente invenção.

A partir dos nucleotídos de alcinil-amino da presente invenção deriva-se um conjunto preferencial de quatro terminantes de cadeia de nucleótido de alcinil-amino marcados por fluorescência (34-37) a seguir indicados. Este conjunto de compostos marcados preparam-se conforme descrito no exemplo 19 fazendo a ligação dos ésteres de N-hidroxisuccinimida 2 com o alcinilamino-nucleóido-trifosfato 6 seguida por desprotecção de amónia.



Utilizaram-se estes quatro terminantes de cadeia marcada por fluorescência em vez dos terminantes de cadeia dideoxinucleotido normalizado para sequenciação de ADN com transcriptase inversa ADN de acordo com o procedimento de Zagursky e outros, "Gene Analysis Techniques"; Vol.2 (1985) p. 89-94. As escadas de sequenciação marcadas por fluorescência resultantes podem analisar-se com instrumentos projectados para detectar moléculas fluorescentes à medida que elas migram durante a electroforese em gel, de preferência com o instrumento descrito no pedido de patente pendente de Robertson e outros (IP-678). No pedido de patente pendente de Robertson e outros faz-se a descrição de um sistema deste tipo utilizando dois filtros fazendo aqui uma breve referência. Conforme descrito por Robertson e outros, coloca-se um par de módulos por cima e por baixo de um plano no qual o feixe de luz de excitação do informador faz o varrimento de quelhas múltiplas de um gel de electroforese. Cada canal contém fragmentos de ADN marcados com informador. cada módulo de detecção é constituído por um tubo fotomultiplicador (TFM) que possui uma área de entrada ampla e um filtro selectivo de comprimento de onda separado colocado entre o seu TFM e a espécie fluorescente no gel. Estes filtros são filtros de interferência que possuem características complementares da banda de transmissão que estimula a acção do filtro dicroico. Os filtros permitem que os TFM gerem sinais que variam em amplitude em sentidos diferentes em função da natureza das espécies. Um dos filtros deixa passar facilmente os comprimentos de onda de emissão inferiores e rejeita os comprimentos de onda de emissão superiores enquanto o outro filtro faz exactamente o contrário. Podem utilizar-se filtros de transmissão com cada um dos filtros de interferência para rejeição da luz proveniente de direcções que formem com o

L.

eixo ângulos superiores a um ângulo pré-determinado. Os filtros de comprimento de onda possuem uma transmissão complementar imperfeita contra as características de comprimento de onda na região de emissão dos quatro corantes, ocorrendo os comprimentos de onda de transição próximo do centro dos espectros de energia radiante das espécies.

A detecção dos fragmentos também se pode efectuar pelos métodos descritos por Smith e outros, Hood e outros, e Ansorge e outros. Contudo, a análise simultânea das quatro bases numa quelha única utilizando a informação proporcionada por este conjunto particular de quatro corantes fluorescentes, apenas pode efectuar-se por meio dos sistemas de processamento de sinal descritos na patente pendente anterior.

No sentido de comparar os resultados obtidos por detecção de fluorescência com os resultados obtidos com as técnicas de sequenciação normalizadas, também se utilizou este conjunto de quatro terminantes de cadeia marcada para gerar fragmentos de sequenciação marcados por fluorescência os quais continham também um informador ^{32}P . (O informador ^{32}P também pode ser incorporado enzimaticamente durante o alongamento com iniciador por adição de dNTP marcado ou por marcação do iniciador em 5' com uma quinase). As escadas de sequenciação duplamente marcadas resultantes podem analisar-se simultaneamente por auto radiografia e por leitor de gel fluorescente. Estas escadas de sequenciação marcadas por fluorescência são muito semelhantes e funcionalmente equivalentes às escadas produzidas pelos

terminantes de cadeia de didesoxinucleotido normalizados com a exceção de, em todas as bandas, haver um desfasamento de duas bases. A intensidade relativa das diversas bandas nestas escadas de sequenciação, modifica-se por adição de um ligante e um corante, mas o terminante de cadeia modificado não parece provocar a falta de quaisquer bandas. Em condições apropriadas de electroforese em gel, o ligante e corante destes terminantes de cadeia não provocam a migração anómala das bandas: uma banda de movimentação mais rápida contém menos bases do que uma banda de movimentação mais lenta. O espaçamento entre bandas adjacentes com corantes diferentes varia ligeiramente dependendo dos corantes que estiverem próximos uns dos outros. Quando se utiliza detecção por fluorescência ou radioactiva, em condições óptimas, estas variações menores na posição e intensidade relativas das bandas não interfere com a utilização destes terminantes de cadeia para sequenciar o ADN.

A utilidade dos nucleotidos de alcinilamino para a preparação de substratos de terminação de cadeia marcada para a sequenciação de ADN não se limita a sintetizar apenas o conjunto de quatro compostos anteriormente indicados (34-37). Construiram-se outras combinações de açúcares, bases e corantes por meio de um ligante de alcinilamino e estes compostos também são úteis para sequenciar o ADN.

Além da sua utilidade para a preparação de terminantes de cadeia marcada com fluorescência, os nucleótidos de alcinilamino da presente invenção são geralmente úteis para a ligação



de uma diversidade de informadores a nucleótidos ou oligonucleótidos. Uma vez que o sítio mais nucleofílico nestas moléculas é o grupo amino introduzido com o ligante, pode ligar-se selectivamente a este átomo de azoto um informador que contenha um ácido carboxílico activado (por exemplo, éster de N-hidroxisuccinimida), um isocianato, um isotio-cianato, um halogeneto de arilo activado (por exemplo,1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno) ou outros grupos funcionais electrofílicos de reactividade apropriada. As preparações marcadas resultantes podem utilizar-se noutras aplicações descritas a seguir.

Uma vez que se utiliza a sub-unidade de base heterocíclica de nucleótidos no código genético, a função de diversos nucleótidos é determinada frequentemente pela natureza da sub-unidade açúcar. Do mesmo modo, a utilidade dos nucleotidos de alcinilamino depende especificamente do tipo da sub-unidade açúcar que está presente. Esta utilidade será diminuída se o ligante alcinil-amino e/ou o informador interferirem com a necessária função do nucleotido. Os nucleótidos contendo ligantes de alcinilamino da presente invenção possuem vantagens distintas: o pequeno volume espacial do ligante alcinilamino minimiza a perturbação do nucleótido; o posicionamento do ligante na posição 5 dos nucleótidos de pirimidina e na posição 7 dos nucleótidos de 7-deazapurina coloca eventualmente o ligante e o informador na estria principal quando se incorpora o nucleótido num ADN de cordão duplo (isto servirá para minimizar a interferência com a hibridação e com outros processos que exijam que seja possível uma conformação de cordão duplo); e os nucleótidos de alcinilamino com um informador associado são substratos excelentes para a transcriptase inversa.

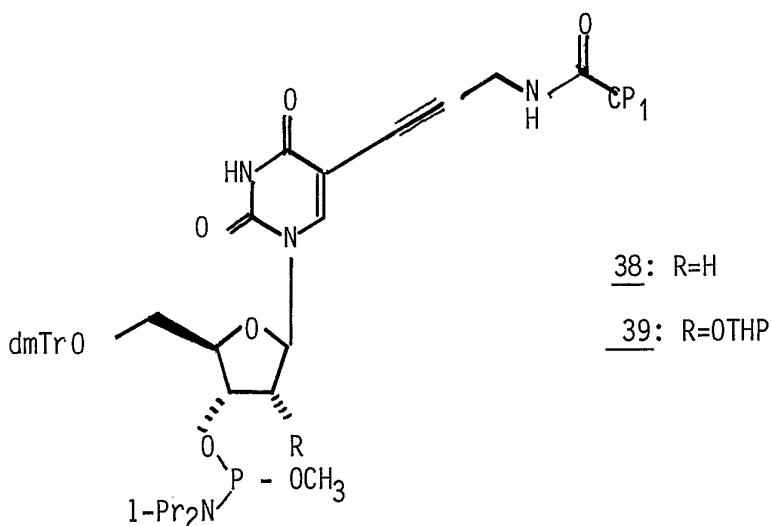
4.

sa AMV. Uma vez que os enzimas relacionados funcionalmente tendem a interagir com os seus substratos por formas idênticas, também é provável que estes nucleótidos possam ser substratos para outras enzimas úteis (tais como as transcriptases inversas, ADN-polimerases, e ARN-polimerases) que efectuem a polimerização de nucleótidos dirigida por uma matriz.

Os nucleótidos de alcinilamino da presente invenção oferecem uma alternativa atractiva para a síntese química (não enzimática) de 2'-desoxi oligonucleotidos marcados. O pedido de patente número PCT/US84/00279 da "Ruth International" descreve um método para a incorporar um grupo informador numa sequência definida de um oligonucleotido de cordão simples. O método engloba a preparação de nucleótidos monoméricos activados e adequadamente protegidos que possuam um ligante, com um grupo amino protegido, a utilização destes nucleótidos monoméricos para sintetizar quimicamente oligonucleotidos, seguindo-se a ligação selectiva de um informador do grupo amino ligante. A pequena dimensão dos ligantes de alcinilamino e a sua localização na posição 5 dos nucleótidos de pirimidina e na posição 7 dos nucleótidos de 7-deazapurina melhoram as características dos oligonucleotidos que os contêm. É possível preparar um monómero activado adequadamente protegido (38) semelhante a um descrito por Ruth a partir de 5-iodo-2'-desoxiuridina disponível comercialmente através da ligação de um ligante de alcinilamino, catalisada por Pd(0)/Cu(I), seguindo-se a dimetoxi-tritilação selectiva do álcool da posição 5', e finalmente pela conversão de uma 3'-fosforamidite com cloro-(di-isopropil-amino)-metoxi-fosfina. Admite-se que este monómero e outros monóme-

4.

ros idênticos contendo alcinilamino possam ser úteis para a síntese de oligonucleótidos e para a ligação do informador de acordo com os métodos descritos por Ruth. (O grupo de protecção trifluoro-acetilo do átomo de azoto ligante elimina-se com os reagentes nucleofílicos e/ou básicos normalmente utilizados para a desprotecção final durante a síntese química de oligonucleótidos). Se o informador não for afectado pelas reacções utilizadas na síntese de oligonucleótidos, poderá ser ligado ao ligante de alcinil-amino num estádio anterior.

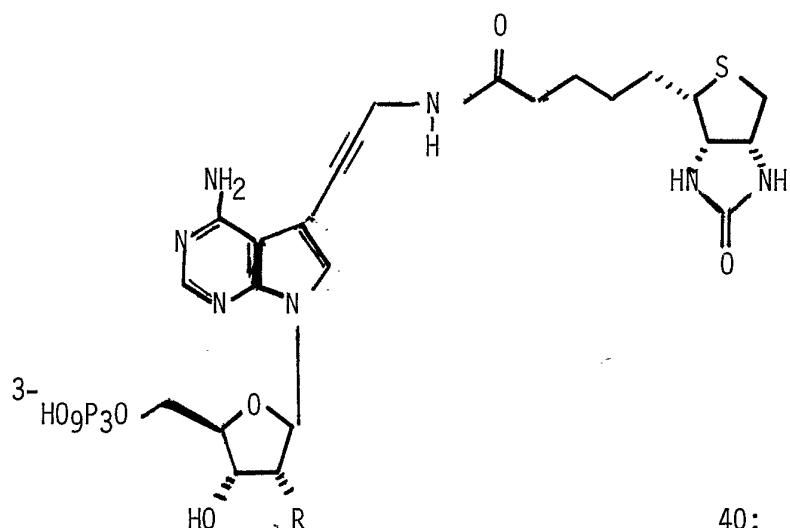


Embora a síntese química de oligoribonucleótidos não seja normalmente tão eficiente ou útil como a síntese de 2'-desoxionucleótidos, pode preparar-se num monômero apropriado; (39) -0-tetrahidropiranilo (OTHP); e utilizar-se para produzir ARN marcado.

Noutra aplicação, a marcação enzimática de ácidos nucleicos de cordão duplo pode ser facilitada através da utilização de ligantes de alcinilamino. Langer e outros, proc. Nat. Acad.

4.

Sci. USA. 78, 6633, (1981) descreveram um método de translacção exacta para a marcação com informadores de biotina de ADN de cordão duplo. Utilizou-se um ligante de alil-amino para ligar a biotina à posição 5 do trifosfato de 2'-desoxiuridina e dos trifosfatos de uridina. Os nucleótidos biotinilados resultantes são substratos para as ADN-polimerases e ARN-polimerases. Em alternativa pode utilizar-se um ligante de alcinilamino para a ligação da biotina ou, em geral, para a ligação de outros informadores tais como os corantes fluorescentes. Os compostos análogos de trifosfato de adenosina (40) e (41) com ligantes de alcinilamino podem preparar-se mais facilmente do que os compostos análogos de adenosina com um ligante alilamino. Os análogos de nucleórido-trifosfatos de (40) e de (41) podem utilizar-se para a tradução exacta da marcação de ADN ou de ARN por procedimentos enzimáticos de Langer e outros.



40: $\text{R} = \text{H}$

41: $\text{R} = \text{OH}$

4.

Os exemplos seguintes ilustram a invenção.

Todas as temperaturas estão em graus Celsius.

(25° C significa a temperatura ambiente). Todas as partes e percentagens são em peso quando não estiverem especificadas de outra forma, excepto para as misturas de líquidos para as quais são em volume. Utilizam-se as abreviaturas seguintes: DMF - dimetilformamida; DMSO - di metilsulfóxido; NHTFA - grupo trifluoroacetamido; TEAB - bicarbonato de trietilamónia; Tris -tris-(hidroximetil)-aminometano; SF -succinilfluoresceína; RMN - espectro de ressonância magnética nuclear; IV -espectro de infra-vermelhos; UV - detecção ou espectro de ultra-violetas; CCF - cromatografia de camada fina em gel de sílica; CLPE - -cromatografia líquida de pressão elevada; CG - cromatografia de gás; pf - ponto de fusão; pf d - ponto de fusão com decomposição; pe - ponto de ebuição. Ao referirem-se os dados RMN apresentam-se os desvios químicos em ppm e as constantes de ligação (J) apresentam-se em Hertz. Nenhum dos pontos de fusão está corrigido. As resinas de permuta de iões lavaram-se com dissolventes orgânicos e aquosos apropriados antes de se utilizarem. A identidade de todos os compostos aqui descritos estabeleceu-se por técnicas analíticas e espectros cópias apropriadas. Salvo quando especificado de outra forma, a purificação por cromatografia em gel de sílica efectuou-se conforme descrito por Still e outros; " J.Org. Chem.", 43 (1978) p. 2923-2926.

EXEMPLO 1

PREPATAÇÃO DE 5' -TRIFOSFATO DE 5-(3-AMINO-1-PROPI-NIL)-2',3'-DIDESOXICITIDINA (42)

(O composto 42 é um exemplo de estrutura 6 em que Het representa citosina (i) e R₁ representa um grupo -CH₂- . Constitui o percursor imediato para o terminante de cadeia marcada 35)

A. PREPARAÇÃO DE N-PROPARGIL-TRIFLUORO-ACETAMIDA (43)

Durante uma hora, adicionou-se gota a gota propargilamina (24,79 g ; 0,450 mole; Aldrich, 99%) a trifluoroacetato de metilo (69,19g; 0,540 mole; 1,2 equivalentes, Aldrich) a 0° C. Depois de se agitar durante mais 1 hora a 0° C a destilação, através de uma coluna Vigreux de 15 cm, proporcionou 62,12g (91%) de trifluoracetamida 43. Sob a forma de um líquido incolor (pe 68,5°-69,5°C a 11 torr)(11X101325/760 Newton m⁻²). Verificou-se por RMN e por CG que este material era homogéneo e utilizou-se trocando-o com material espectroscopicamente idêntico preparado por acilação de propargilamina com anidrido de ácido trifluoroacético.

¹H-RMN (CDCl₃) : 6,85 (1 largo s, 1H, NHTFA), 4,17 (dd, J=5,6 e 2,5, 2H, CH₂), 2,35 (t, J = 2,5, 1H, CH). I.V. puro; cm⁻¹) : 3300 (N-H), 3095 e 2935 (C-H), 2130(acetileno), 1720 (C=O), 1550 (N-H), 1430, 1365, 1160, 1040, 998, 918, 857, 829, 772 e 725.

B. PREPARAÇÃO DE 5-IODO-2',3'-DIDESOXICITIDINA (44)

Durante 19 horas fez-se o refluxo de uma solução de 2',3'-didesoxicitidina (2,11 g; 10 mmole, Raylo) e de acetato de mercúrio (3,35g ; 10,5 mmole, Fisher) em 50 ml de metanol. Diliuiu-se a suspensão branca resultante com metanol (50 ml) e com diclorometano (100 ml). Adicionou-se iodo (3,05g; 12 mmole) e agitou-se a suspensão a 25° C até aparecer uma solução púrpura clara. Decorridas 4 horas adicionou-se a forma de base livre da resina AG3 X4A (20 ml; 38 meq., bio-rad; uma resina de poliestireno ligeiramente alcalina) e fez-se borbulhar ácido sulfídrico na reacção durante 15 minutos. A precipitação completa do mercúrio (II) verificou-se por CCF. Filtrou-se o produto da reacção com um filtro e lavou-se o filtro com metanol/dicloro-metano 1:1. Evaporou-se o filtrado sobre gel de sílica (10g) e este gel de sílica assim carregado colocou-se na parte superior de uma coluna de gel de sílica de 150 g. A eluição com 5%, 10% e 20% de metanol em diclorometano proporcionou 2,79 g (83%) de iodeto 44 sob a forma de um sólido cristalino incolor. Duas recristalizações no seio de água em ebulação proporcionaram, após a secagem em vácuo a 50° C, grandes prismas analiticamente puros (pf: d 178° C).

¹H-RMN (DMSO-d₆): 8,50 (s, 1H, H6), 7,73 (s largo, 1H, -NH₂a), 6,53 (s largo, 1H -NH₂b), 5,86 (dd, J = 6,5 e 2,1, 1H, H1'), 5,19 (t, 1H, 5'OH), 4,04 (m, 1H H4'), 3,75 (ddd, J=12,1, 5,2 e 2,9, 1H, H5' a), 3,53 (dt, J = 12,1 e 3,8, 1H, H5'b) e 2,3-1,7 (m, 4H, H2' e H3'). Calculado para C₉H₁₂N₃O₃I: C 32,07%, H 3,59%, N 12,46%. Encontrado: C 32,05%, H 3,80%, N 12,46%.

C. PROCEDIMENTO GERAL PARA O ACOPLAMENTO DE AMINO-ALCINOS A IODO-NUCLEOSIDOS. PREPARAÇÃO DE 5-(3-TRIFLUORO-ACETAMIDO-1-PROPINIL)-2',3' -DIDESOXICITIDINA (45)

Carregou-se um balão de 50 ml de três tubula duras com iodocitidina 44 (770 mg; 2,00 mmole) e com iodeto de cobre (76,2 mg; 0,400 mmole; 0,20 eq.; aldrich, Gold Label). Depois de se limpar o balão com árgon adicionou-se dimetilformamida seca (10 ml, Aldrich) para se obter uma solução 0,2 M de iodocitidina que continha iodeto de cobre em suspensão. Com uma seringa adicionou-se N-propargil trifluoroacetamida (0,70 ml; 6,00 mmole; 3,0 eq.) e trietilamina (0,56 ml; 4,00 mmole; 2,0 eq., armazenada em peneiros moleculares). Pessou-se para um frasco tetraquis-(trifenilfosfina)-paládio (0) (231mg; 0,20 mmole; 0,10 eq.) numa caixa seca e adicionou-se à mistura reaccinal. Dissolveu-se o iodeto de cobre para se obter uma solução amarela que escureceu gradualmente ao fim de algumas horas. deixou-se a reacção evoluir até que a CCF indicou que o material de partida estava completamente consumido. Decorridas 4 horas diluiu-se a mistura reaccional com 20 ml de metanol/diclorometano 1:1 e adicionou-se resina AG1 X8 sob a forma de bicarbonato (Bio-rad; 2,0 g; cerca de 6 eq.; resina de poliestireno de permuta de aníões fortemente alcalina). Depois de se agitar durante aproximadamente 15 minutos a libertação de gás cessou. Decorridos 30 minutos, filtrou-se a mistura reaccional e lavou-se a resina com diclorometano/metanol 1:1. Os filtrados combinados concentraram-se rapidamente num evaporador rotativo. (A eliminação da dimetilformamida levou aproximadamente 10 minutos a

45°C e a 2 torr). Purificou-se imediatamente o resíduo por cromatografia em 100 g de gel de sílica utilizando 10%, 15% e 20% de metanol em diclorometano. A eliminação do dissolvente das fracções apropriadas proporcionou 651 mg (90%) de nucleóside de alcinilamina 45 sob a forma de uma espuma cristalina amarela que se verificou ser homogénea por CCF e por RMN. Para o produto de uma preparação semelhante verificou-se por análise elementar que se tratava de um hemihidrato.

^1H -RMN(DMSO-d₆): 9,96 (s largo, 1H, NHTFA), 8,32 (s, 1H, H6), 7,76 (s largo, 1H, NH₂a), 6,78 (s largo, 1H, NH₂b), 5,88 (dd, J=6,5 e 2,5, 1H, H1'), 5,13 (t, J = 5,1, 1H, 5'OH), 4,28 (d, J=5,0, 2H, -CH₂-), 4,04 (m, 1H, H4'), 3,73 (ddd, J = 12, 5,0 e 3,1, 1H, H5'a), 3,53 (dt, J=12,1 e 4,0, 1H, H5'b), 2,3-1,7 (m, 4H, H2 e H3'). ^{10}F -RMN (DMSO-d₆): -74,0 (s). UV (MeOH): máximos a 238,5 (17,100) e 295,5 (9, 300). Calculado para C₁₄H₁₅N₄O₄F₃ 1/2H₂O: C 45,53, H 4,37, N 15,17. Encontrado: C 45,56, H 4,52, N 15,26.

D. PREPARAÇÃO DE PIROSFOSFATO DE TRIS-(TRI-N-BUTIL-AMONIA)

Dissolveu-se decahidrato de pirofosfato de tetra-sódio (4,46g; 10 mmole) numa quantidade mínima de água (aproximadamente 50 ml) e fez-se passar por uma coluna de resina AG50W X8 (malha 100-200 mesh, leito de 4X10 cm; resina de poliestireno de permuta de catiões fortemente ácida) vertida em água. Fez-se a eluição da coluna com água e recolheu-se o eluente num balão arrefecido

com gelo até o pH do eluente se aproximar da neutralidade. Adicionou-se tri-n-butilamina (Aldrich Gold Label, 7,1 ml; 30 mmole) ao eluente e agitaram-se as duas faces vigorosamente até toda a amina estar dissolvida. Liofilizou-se a solução resultante. Fez-se a evaporação do resíduo duas vezes em conjunto com piridina seca e uma vez com dimetilformamida seca. Dissolveu-se o resíduo em dimetilformamida seca (10 ml) e guardou-se a solução 1,0 M resultante (durante pelo menos 1 mês) a 0°C, numa atmosfera de árgon até ser utilizada.

E. PROCEDIMENTO GERAL PARA CONVERTER NUCLEÓSIDOS DE ALCINILAMINO PROTEGIDOS NOS CORRESPONDENTES 5'-TRIFOSFATOS E PARA ELIMINAÇÃO DO GRUPO DE PROTECÇÃO TRIFLUORO-ACETILO. PREPARAÇÃO DE 5' -TRIFOSFATO DE 5-(3-AMINO-1-PROPINIL)-2',3' -DIDESOXICITIDINA (42).

Dissolveu-se nucleosido de alcinilamino 45 (361 mg; 1,00 mmol) em fosfato de trimetilo (2,0 ml, Aldrich Gold Label) enquanto se agitava numa atmosfera de árgon, num balão seco em estufa. Arrefeceu-se a solução para menos 10°C e adicionou-se oxicloreto de fósforo (0,093 ml; 1,00 mmole, Aldrich Gold Label) com o auxílio de uma seringa. Depois de se atingir a mistura reacional a menos 10°C durante 30 minutos, adicionou-se uma segunda aliquota de oxicloreto fosforoso (0,093 ml; 1,00 mmole) e deixou-se a solução aquecer lentamente até 25°C enquanto se mantinha a agitação. Temperaram-se aliquotas da mistura reacional com hidróxido aquoso 1N e fez-se a análise por CLPE. Quando a conversão no correspondente nucleótido-monofosfato atingiu um máximo (neste caso decorridos 100 minutos após a segunda adição de oxicloreto de fósforo), adicionou-se a mistura reacional, gota a gota, a uma solução previamente arrefecida (-10°C) de pirofos-

fato de tris-(tri-n-butilamónia) (6,0 ml da solução 1,0 M anterior em dimetilformamida seca). Deixou-se a solução aquecer lentamente até 25°C enquanto se mantinha a agitação numa atmosfera de árgon. Decorridos 100 minutos, adicionou-se lentamente a solução reaccional a uma solução previamente arrefecida (0°C) de trietilamina (1,4 ml) em água (20 ml). Agitou-se a solução com arrefecimento em gelo durante 15 minutos e depois deixou-se em repouso durante a noite à temperatura aproximada de 2°C.

Eliminaram-se os produtos voláteis por evaporação no vácuo a 25°C e a 0,5 torr ($0,5 \times 101325 / 760$ Newton m⁻²). Dissolveu-se novamente o resíduo em água (75 ml) e aplicou-se a uma coluna de resina de permuta de iões DEAE-SEPHADEX (A-25-120; leito de 2,6 X 65 cm) que havia sido equilibrada com: 1)pH 7,6, TEAB aquoso 1,0 M (300 ml); 2) bicarbonato de potássio aquoso 1,0 M (300 ml) e 3) pH 7,6; TEAB aquoso 0,1M (300 ml). Eluiu-se a coluna com um gradiente linear de TEAB aquoso de pH 7,6 desde 0,1 M (1 litro) até 1,0 M (1 litro). A coluna evoluiu a 100 ml/h enquanto se recolhiam fracções de 12 em 12 minutos. Controlou-se a eluição por absorvência a 270 nm (40 AUFS). O material eluido desejado apresentou uma banda principal bem separado próximo do fim do gradiente (Fracções 73-80). Combinaram-se as fracções que continham o produto, concentraram-se (a uma temperatura inferior a 30°C) e fez-se a evaporação conjunta duas vezes, com etanol absoluto. Extraíu-se o resíduo com água (20,4 ml) e liofilizou-se.

Extraíu-se o produto intermediário com água (12,5 ml) e adicionou-se hidróxido de amónia concentrado (12,5 ml).

Depois de se agitar durante 3,5 horas manteve-se a agitação sob aspiração no vácuo durante 2 h para eliminar o excesso de gás de amónia e depois liofilizou-se. Extraíu-se o resíduo com TEAB aquoso 0,1 M (10 ml) a um pH 7,6 e aplicou-se a uma coluna de resina de permuta de iões "DEAE-SEPHADEX" (A-25-120, leito de 1,6X55 cm) que havia sido preparada conforme atrás descrito. Eluiu-se a coluna enquanto se recolhiam fracções de 6 ml com um gradiente linear de TEAB desde 0,1 M (280 ml) até 1,0 M (280 ml). O produto eluído apresentou um pico principal único. Combinaram-se as fracções para as quais se admitiu que continham o produto puro (39-45), concentrou-se (a uma temperatura inferior a 30°C), evaporou-se em conjunto com etanol absoluto (2X) e extraíu-se com água (9,8 ml). Submeteu-se a solução à absorção de UV e a CLPE e depois liofilizou-se.

A solução do produto diluída apresentou máximos de absorção a 240 e a 293,5 nm em 50 mM de tampão Tris aquoso a um pH 8,2. Admitindo para o produto um coeficiente de absorção igual ao do material de partida (9,300), a quantidade de produto, baseada na absorção a 293,5 nm, foi de 0,32 mmole (32%). A cromatografia CLPC (Zorbax SAX; 0,2 M; pH 6,5; fosfato de potássio aquoso; controlado a 270 nm) do produto final apresentou essencialmente um pico único (>99%).

^1H -RMN (D_2O) : 8,57 (s, 1H, H6), 6,03 (dd, $J = 6,4$ e $1,6, 1\text{H}$ H1'), 4,42 (m, 2H H4' e H5'a), 4,18 (ddd, $J = 12, 5,5$ e $3, 1\text{H}$, H5'b), 4,036 (s, 2H, $-\text{CH}_2$), 2,5-1,9 (m, 4H, H2' e H3'), mais os picos do íão contrário (trietyl-amónia). ^{31}P -RMN (D_2O): -9,02 (d, $J=20, 1\text{P}$), -9,74 (d, $J=$

= 20,1P), -21,37 ($t, J=20$, 1P). UV (ph 8,2 aq Tris): máximos a 240 e 293,5 nm.

EXEMPLO 2

PREPARAÇÃO DE 5' -TRI OSFATO DE 5-(3-AMINO -1-PROPINIL)- -2',3'-DIDESOXIURIDINA (46)

(O composto 46 é um exemplo da estrutura 6 em que Het representa um grupo uracilo (h) e R₁ representa um grupo -CH₂-). Trata-se do precursor imediato do terminante de cadeia marcada 34).

A. PREPARAÇÃO DE 5-IODO-2',3'-DIDESOXIURIDINA (47):

Dissolveu-se didesoxiuridina (2,122 g; 10,0 mmole) em 30 ml de metanol quente e, após arrefecimento até 25°C, adicionou-se, durante 5 minutos, mono-cloreto de iodo (4,06 g; 25 mmole; 2,5 eq. Fisher) em metanol (20 ml). Aqueceu-se a mistura reacional púrpura escura num banho a 50°C numa atmosfera de azoto, durante 20 minutos e depois arrefeceu-se imediatamente num banho de gelo/água. Depois de ter repousado sem agitação durante 165 minutos, recolheu-se o precipitado resultante por filtração e lavou-se com metanol frio (2 X 10 ml). A secagem no vácuo durante a noite originou 2,232 g (66%) de iodeto 47 sob a forma de micro-cristais branco sujo. Este material utilizou-se sem purificação posterior na reacção seguinte, mas purificaram-se outras preparações por cromatografia ou por re-

cristalização no seio de metanol em ebulição (30 ml/g), para se obter agulhas brancas (pf com decomposição 160⁰-164⁰ C). A análise RMN provou que o precipitado bruto era homogéneo, mas também que o protão de 5-hidroxilo era muito largo devido à permuta catalisada pelos traços de impurezas. Os materiais cromatografados ou recristalizados apresentaram espectros em que este protão, tal como habitualmente, era um triplete agudo.

¹H-RMN (DMSO-d₆): 11,60 (s largo, 1H, H3), 8,57 (s,1H,H6),5,90 (dd, J = 2,0 e 6,6, 1H,H1'), 5,2 (s largo, 1H,5'OH),4,06 (m,1H, H4'), 3,75 e 3,53,(2H, H5'), 2,26, 2,02 e 1,84 (m, 4H, H2' e H3').

B. PREPARAÇÃO DE 5-(3-TRIFLUOROACETAMIDO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDEOXIURIDINA (48).

Durante 3 horas fez-se o acoplamento de iodo-uridina 47 a N-propargiltrifluoroacetamida, de acordo com o método geral apresentado no exemplo 1C. A cromatografia com um gradiente de 0-5% de metanol em diclorometano originou material que se verificou ser homogéneo por CCF,mas cuja secagem foi difícil. Após diversas evaporações do produto cromatografado em conjunto com clorofórmio e secagem no vácuo, obteve-se 536,5 mg de nucleósido de alcinilamino 48 sob a forma de uma espuma branca. Verificou-se que este material era homogéneo por CCF e que era puro por RMN com a excepção da existência de uma pequena quantidade (36 mole%; rendimento de 66% corrigido). de clorofórmio.

¹H-RMN (DMSO-d₆): 11,61 (s, 1H, H3), 10,07 (t distorcido, 1H, NHTFA), 8,35 (s, 1H H6), 7,26 (s, 0,39H, CHCl₃), 5,89 (dd, J = 6,6 e 3,2, 1H, H1'), 5,15 (t, J = 5,2, 1H, 5' OH), 4,22 (d largo, 2H, -CH₂N-), 4,04 (hept aparente, J = 3,5, 1H, H4'), 3,73 e 3,53 (m, 2H, H5'), 2,26, 2,03 e 1,84 (m, 4H, H2' e H3').

CCF (diclorometano/metanol 95:5, duas eluições, UV): Iodeto de partida 47, R_f = 0,37; produto 48, 0,28; catalisadores, 0,95 e 0,80 e um aspecto riscado ligeiro.

C. PREPARAÇÃO DE 5' -TRIFOSFATO DE 5-(3-AMINO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDESOXIURIDINA (46).

Converteu-se o nucleósido de alcinilamino 48 (0,30 mmole) no trifosfato correspondente e eliminou-se o seu grupo trifluoroacetilo de acordo com o procedimento geral apresentado no exemplo 1E. Após a adição da segunda aliquota de oxicloreto de fósforo, permitiu-se que a fosforilação evoluísse durante um total de 210 minutos. Admitindo um coeficiente de absorção para o produto igual ao do material de partida (13 000), a produção de trifosfato 46, baseada na sua absorção de UV a 291,5 nm foi de 18.

EXEMPLO 3

PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 7-(3-AMINO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDESOXIGUANOSINA (49)

(O composto 49 é um exemplo da estrutura 6 na qual het representa 7-deazaguanina (k) e R₁ representa um grupo -CH₂-). Trata-se do per-

4.

cursor imediato do terminante de cadeia marcada 37.

A. PREPARAÇÃO DE 6-METOXI-2-METILTIO-9-(3,5-DI-O-p-TOLUOIL-2-DESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (9).

Secou-se azeotropicamente 6-metoxi-2-metiltio-7-deazapurina (8; 9,2g, preparado de acordo com o procedimento de F. Seela e outros, "Chem. Ber."; Vol.111; (1978) p. 2925 por dissolução em 150 ml de piridina seca e evaporou-se até à secagem a 30°-35°C. Com este material fez-se uma suspensão em 450 ml de acetonitrilo seco, à temperatura ambiente, numa atmosfera de azoto e adicionou-se hidreto de sódio (2,16 g de uma suspensão a 60% em óleo) com agitação. Decorridos 45 minutos adicionou-se 1-cloro-2-desoxi-3,5-di-O-p-toluoil- α -D-ribofuranose (18,6 g preparado de acordo com o procedimento de M. Hoffer; "Chem. Ber."; Vol. 93 (1960) p. 2777 em três porções iguais durante 20 minutos. Depois de se agitar a mistura reaccional durante mais de 45 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se ácido acético (1 ml) e dicloromatano (300 ml). Filtrou-se a mistura por succção através de uma almofada de filtragem e evaporou-se o filtrado até à secagem. Dissolveu-se o resíduo em benzeno e lavou-se esta solução com água (2X) e com uma solução salina (1X). Depois de se secar a camada orgânica sobre sulfato de sódio e após a evaporação, dissolveu-se o resíduo em metanol (400 ml) e deixou-se cristalizar para se obter 19,24 g (73,8%) de produto ribossilado 9 sob a forma de cristais incolores (pf 106°-107°C).

^1H -RMN (CDCl_3): 2,42 (s, 3H, toluoilo CH_3), 2,44 (s, s, toluoilo CH_3), 2,64 (s, 3H, SCH_3), 2,70 e 2,89 (m, 2H, $\text{H}2'$), 4,08 (s, 3H, OCH_3),

L.

4,56 (m , 1H, H_{3'}), 4,65 (m , 2H, H_{5'}), 5,74 (m , 1H, H_{4'}), 6,44 (d, J=4, 1H, H₇), 6,77 (dd, J = 8 e 6, 1H, H_{1'}), 7,05 (d, J=4, 1H, H₈) e 7,25 e 7,95 (m , 8H, toluoilo H).

A recristalização de uma amostra do material anterior no seio de metanol contendo uma pequena quantidade de diclorometano originou cristais de pf 109⁰-110⁰C.

B. PREPARAÇÃO DE 6-METOXI-2-METILTIOL-9-(2-DESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (10).

Durante 1,5 horas fez-se o refluxo de uma suspensão de éster 9 (19 g) e da forma hidróxido da resina REXYN 201 (38 g; resina de poliestireno de permuta de anões fortemente alcalina) em 600 ml de metanol, numa atmosfera de azoto. Filtrou-se por sucção a suspensão quente para se eliminar a resina e evaporou-se o filtrado até à secagem. Dissolveu-se o resíduo sólido em éter (450 ml) e, decorridos 10 minutos, filtrou-se a solução através de uma almofada de filtração para eliminar uma pequena quantidade de uma impureza colorida. Nucleou-se a solução com cristais do produto desejado obtido a partir de uma reacção anterior e deixou-se em repouso durante a noite a 25⁰C. recolheu-se o diol cristalino 10 por filtração e concentrou-se o licor-mãe para se obter uma segunda colheita. lavou-se completamente cada colheita com éter e secou-se para se obter um total de 8,43 g (78,0%) de diol 10 sob a forma de cristais incolores (pf 129⁰-130⁰C).

L.

¹H-RMN (DMSO-d₆): 2,21 e 2,55 (m, 2H, H₂'), 2,56 (s, 3H, SCH₃), 3,53 (m, 2H, H₅'), 3,82 (m, 1H, H₃'), 4,02 (s, 3H, OCH₃), 4,36 (m, 1H, H₄'), 4,90 (t, J = 5,5, 1H, H_{5'}OH), 5,30 (d, J = 5,5, 1H, H_{3'}OH), 6,48 (d, J = 4,1H, H₇), 6,55 (dd, J = 8 e 6, 1H, H_{1'}), 7,48 (d, J = 4, 1H, H₈).

A recristalização de uma amostra deste material no seio de diclorometano contendo uma pequena quantidade de metanol originou cristais de pf 130⁰-131⁰ C.

C. PREPARAÇÃO DE 6-METOXI-2-METILTIO-9-(5-O-TRIFENIL-METIL-2-DESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (11).

Secou-se azeotropicamente o diol 10 (7,2 g) por dissolução em piridina seca e por evaporação da solução até à secagem a 35⁰C. Dissolveu-se o resíduo em piridina seca (100 ml) e adicionou-se cloreto de trifenilmetilo (8,0 g), trietilamina (4,0 ml) e 4-(dimetilamino)piridina (300 mg). Depois de se aquecer a mistura reaccional a 65⁰C numa atmosfera de azoto, durante 30 minutos, fez-se uma segunda adição de cloreto de trifenilmetilo (1,0 g) e manteve-se o aquecimento durante 16,5 horas. depois de arrefecer concentrou-se a mistura reaccional e repartiu-se o resíduo entre diclorometano e água. Extraiu-se a camada aquosa com diclorometano e lavaram-se as camadas orgânicas combinadas com ácido clorídrico 0,3 N, com bicarbonato de sódio aquoso e com uma solução salina. Depois de se secar sobre sulfato de sódio e de se concentrar, a purificação do produto bruto por cromatografia em gel de sílica com 0%, 1%, 1,5% e 2% de metanol

em diclorometano originou 12,1 g (94,5%) de éter monotritílico 11 sob a forma de um produto vidrado incolor.

¹H-RMN (CDCl₃): 2,58 (s, 3H, SCH₃), 2,42 e 2,62 (m, 2H, H2'), 3,37 (m, 2H, H5'), 4,04 (m, 1H, H3'), 4,08 (s, 3H, OCH₃), 4,60 (m, 1H, H4'), 6,40 (d, J = 4, 1H, H7), 6,68 (t aparente, J = 7, 1H, H1'), 7,00 (d, J = 4, 1H, H8), 7,27 e 7,43 (m, 15H, tritilo H)

Estes dados obtiveram-se a partir de uma porção diferente de 11 preparado conforme anteriormente descrito.

D. PREPARAÇÃO DE 6-METOXI-2-METILTIO-9-(5-O-TRIFENILMETIL-2,3-DIDESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (12).

Durante 2 horas agitou-se a 25⁰C uma solução de éter tritílico 11 (12,1 g), 4-(dimetilamino)-piridina (9,2 g) e clorotionocarbonato de fenilo (7,5 ml, Aldrich) em diclorometano seco (220 ml), numa atmosfera de azoto. Como a análise por CCF indicou que a reacção estava incompleta, adicionou-se clorotiocarbonato de fenilo (4,0 ml) e agitou-se a mistura reacional durante mais de 1 hora. Diluiu-se a solução com diclorometano (280 ml) e lavou-se sequencialmente com ácido clorídrico 0,5 N (500 ml), hidróxido de sódio 0,5 N (500 ml) e uma solução salina. Secou-se a camada orgânica sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secagem.

Dissolveu-se o tionocarbonato bruto resultante em tolueno seco (350 ml) e adicionou-se azoiso-bis-butironitrilo

(350 mg) e hidreto de tri-n-butil-estanho (10 ml). Aqueceu-se a solução resultante a 100°-105° C durante 10 minutos. Depois de arrefecer, diluiu-se a solução com um pouco de éter e agitou-se com fluoreto de potássio aquoso a 10% (350 ml). Filtraram-se as duas camadas através de uma almofada d'efiltração (para eliminar uma impureza escura) e fez-se a separação. Lavou-se a camada orgânica com hidróxido de potássio 0,75 N e com uma solução salina, secou-se sobre sulfato de sódio e concentrou-se. A cromatografia do óleo resultante, em gel de sílica com diclorometano/éter 1:1 e depois com diclorometano originou 9,93 g (84.5%) de didesoxinucleóside 12 sob a forma de um sólido incolor (pf 122°-124°).

¹H-RMN (CDCl_3): 2,10, 2,33, e 2,43 (m, 4H, H_{2'} e H_{3'}), 2,60 (s, 3H, SCH₃), 3,30 (m, 2H, H_{5'}), 4,08 (s, 3H, OCH₃), 4,29 (m, 1H, H_{4'}), 6,36 (d, J = 3,7, 1H, H₇), 6,53 (dd, J = 7 e 4, 1H, H_{1'}), 7,09 (d, 1H, J = 3,7, H₈), 7,25 e 7,45 (m, 15H, tríptilo H).

E. PREPARAÇÃO DE 7-IODO-6-METOXI-2-METILTIO-9-(5-O-TRIFENILMETIL-2,3-DIDESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (13).

Adicionou-se N-iodo-succinimida (10,0 g) a uma solução de deazapurina 12 (9,9 g) em dimetilformamida seca (550 ml). Depois de se agitar no escuro, numa atmosfera de azoto durante 16 horas, adicionou-se bicarbonato de sódio aquoso a 10% (2,5 ml) e concentrou-se a mistura reacional no vácuo a 50°C para se obter um volume de 100 ml. Repartiu-se esta solução entre água e acetato de etilo. Lavou-se a camada orgânica com hidrossulfato de sódio aquoso

L.

a 5% e com uma solução salina, secou-se sobre sulfato de sódio e concentrou-se. A cromatografia do produto levemente impuro, sobre gel de sílica com dicloro-metano, originou 11,68 g (95,6%) de iodeto 13 sob a forma de um sólido vidrado incolor.

^1H -RMN (CDCl_3): 2,06, 2,24, e 2,41 (m, 4H, H_{2'} e H_{3'}), 2,58 (s, 3H, SCH₃), 3,30 (m, 2H, H_{5'}), 4,10 (s, 3H, OCH₃), 4,29 (m, 1H, H_{4'}), 6,47 (dd, J = 6 e 4, 1H, H_{1'}), 7,19 (s, 1H, H₈), 7,30 e 7,46 (m, 15 H, tritio-H)

Estes dados obtiveram-se a partir de uma porção diferente de 13, preparada conforme atáis descrito.

F. PREPARAÇÃO DE 7-IODO-2-METILTIOL-9-(5-O-TRIFENILMETIL-2,3-DIDESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAPURIN-4-ONA (14).

Preparou-se tiocresolato de sódio por adição de metóxido de sódio (1 eq.) a uma solução de tiocresol em metanol e por evaporação subsequente até à secagem. Durante 4,5 horas fez-se o refluxo de uma mistura de éter metílico 13 (4,0 g), tiocresolato de sódio (4,0 g) de hexametilfosforamida (10 ml) em tolueno seco (150 ml), numa atmosfera de azoto. Depois de arrefecer, repartiu-se a mistura entre acetato de etilo e água. Lavou-se a camada orgânica com água e com uma solução salina, secou-se sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secagem. A cromatografia do produto bruto resultante em gel sílica, com 0% e 2% de metanol em diclorometano originou 3,80 g

(97,0%) de deazapurinona 14 sob a forma de um sólido vidrado incolor.

¹H-RMN ($CDCl_3$): 2,05, 2,25, e 2,42 (m, 4H, H_{2'} e H_{3'}), 2,60 (s, 3H, SCH₃), 3,30 (m, 2H, H_{5'}), 4,28 (m, 1H, H_{4'}), 6,40 (dd, J = 7 e 4, 1H, H_{1'}), 7,05 (s, 1H, H₈), 7,30 e 7,46 (m, 15H, tritilo H), 10,00 (s largo, 1H, H₁).

G. PREPARAÇÃO DE 7-IODO-5'-O-TRIFENILMETIL-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZAGUANOSINA (15).

Adicionou-se ácido meta-cloroperoxibenzóico (1,23 g; 85%, Aldrich) a uma solução agitada de metiltio-éter 14 (3,6 g) em diclorometano seco (150 ml) a 0°C, numa atmosfera de azoto. Decorridos 15 minutos removeu-se o banho de arrefecimento e manteve-se a agitação a 25°C durante 40 minutos. Lavou-se esta solução com bicarbonato de sódio aquoso e com uma solução salina e secou-se sobre sulfato de sódio. Adicionou-se metanol (2% em volume) e fez-se passar a solução resultante através de uma pequena almofada de gel de sílica para eliminar impurezas polares. Dissolveu-se o sulfóxido bruto resultante (3,07 g) em dioxano (40 ml) e colocou-se numa bomba revestida com vidro. Adicionou-se amônia (10,0 g) e aqueceu-se a mistura a 100°C durante 2 horas numa autoclave. Evaporou-se a solução resultante até à secagem. Dissolveu-se o resíduo em diclorometano (20 ml) e filtrou-se através de uma almofada de filtração. Adicionou-se metanol (40 ml) à solução e ao arrefecer obteve-se 1,57 g de um produto incolor cristalizado. Evaporou-se o licor-mãe e purificou-se por meio de cromatografia líquida de média pressão sobre gel de síli-

ca com 5% de metanol em diclorometano, para se obter mais 328 mg de produto sob a forma de cristais incolores. A produção total de deazaguanosina 15 foi de 1,90 g (55,4%).

¹H-RMN (CDCl_3): 2,05, 2,23 e 2,35 (m, 4H, H_{2'} e H_{3'}), 3,29 (m, 2H, H_{5'}), 4,26 (m, 1H, H_{4'}), 5,90 (s largo, 2H, NH₂), 6,24 (dd, J = 7 e 4, 1H, H_{1'}), 6,90 (s, 1H, H₈), 7,30 e 7,46 (m, 15H, tritílico H) 10,90 (s largo, 1H, H₁)

A recristalização de uma amostra deste material no seio de metanol/diclorometano, originou cristais de pf 201⁰-203⁰C.

H. PREPARAÇÃO DE 2',3'-DIDESOXI-7-IODO-7-DEAZAGUANOSINA (16).

Durante 10 minutos agitou-se à temperatura ambiente uma solução de éter tritílico 15 (1,7 g) em ácido fórmico (12 ml). Seguidamente fez-se a evaporação rápida até à secagem da suspensão amarela resultante, no vácuo, a 30⁰C. A cromatografia do resíduo em gel de sílica com 5%, 7% e 10% de metanol diclorometano originou 940 mg de um sólido incolor. A trituração deste sólido no seio de éter contendo um pouco de diclorometano originou 838 mg (81,0%) de nucleosido 16 sob a forma de cristais incolores.

¹H-RMN (DMSO-D_6): 1,95, 2,09, e 2,26 (m, 4H, H_{2'} e H_{3'}), 3,48 e 3,54 (m, 2H, H_{5'}), 3,98 (m, 1H, H_{4'}), 4,90 (t largo, J = 5, 1H, 5' OH), 6,08 (m, 1H, H_{1'}), 6,32 (s largo, 2H, NH₂), 7,12 (s, 1H, H₈), 10,46 (s largo 1H, H₁).

4.

I. PREPARAÇÃO DE 7-(3-TRIFLUOROACETAMIDO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDEOXI-7-DEAZAGUANOSINA (50).

Durante 2,25 horas fez-se o acoplamento do iodeto 16 (376 mg; 1,00 mmole) a N-propargil-trifluoroacetamida, de acordo com o método geral apresentado no exemplo 1C.0 produto e o material de partida não se distinguiram por CCF pelo que se fez o controlo da reacção por CLPE de fase inversa (10 cm ODS, 1 ml/min., gradiente desde 100% de água até 100% de metanol durante 5 minutos, depois 100% de metanol, com detecção de UV a 280 nm: iodeto de partida 16, 5,49 minutos; produto 50, 5,75 min.; intermediário, 6,58 min.). O produto bruto apresentou-se francamente solúvel em diclorometano pelo que se concentrou no seio de uma solução de diclorometano/metanol sobre gel de sílica (5 g) antes de se carregar numa coluna de cromatografia. A eluição com 2%, 5%, 7% e 10% de metanol em diclorometano originou 300 ml (78%) de nucleóside de alcinil-amino 50 sob a forma de um sólido amarelo.

D
¹H-RMN (DMSO -d): 1,96, 2,08 e 2,28 (m, 4H, H_{2'} e H_{3'}), 3,47 e 3,55 (m, 2H, H_{5'}), 3,99 (m, 1H, H_{4'}), 4,22 (s largo, 2H, -CH₂-), 4,90 (t, J = 5, 1H, 5'OH), 6,09 (dd, J = 6 e 4, 1H, H_{1'}), 6,33 (s largo, 2H, NH₂), 7,30 (s, 1H, H₈), 10,05 (s largo, 1H, NHTFA) 10,50 (s largo, 1H, H₁). ¹H-deslizado ¹³C-RMN (DMSO-d₆): 155,5 (q, J = 36,5 trifluoroacetil-carbonilo), 157,8, 153,1 e 149,9 (C2, C4 e C6), 122,6 (C8), 115,9 (q, J = 288, CF₃), 99,4 e 97,5 (C7 e C5), 84,2 e 77,4 (acetilénico), 83,2 e 81,0 (C1' e C4'), 62,9 (C5'), 29,7 (propargílico), 31,8 e 25,8 (C2' e C3').

4.

Estes dados ^{13}C -RMN obtiveram-se a partir de uma porção diferente de 50 preparada conforme atrás descrito.

J. PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 7-(3-AMINO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZAGUANOSINA (49) .

Converteu-se o nucleosido de alcinilamino 50 (0,90 mmole) no 5'-trifosfato correspondente e seguidamente eliminou-se o grupo de protecção trifluoroacetilo, seguindo o procedimento geral apresentado no exemplo 1E. Após a segunda adição de oxicloreto fosforoso, agitou-se a mistura reacional durante mais de 165 minutos. Admitindo um coeficiente de absorção para o produto igual ao do material de partida (11.900) o rendimento de 5'-trifosfato 49, baseado na sua absorção a 272,5 mn, foi de 18%.

EXEMPLO 4

D. PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 7-(3-AMINO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (51).

(O composto 51 é um exemplo da estrutura 6 na qual Het representa 7-deaza-adenina (j) e R_1 representa um grupo $-\text{CH}_2-$. Trata-se do precursor imediato do terminante de cadeia marcada 36.)

A. PREPARAÇÃO DE 2'-ACETOXI-3'-BROMO-5'-(2-ACETOXI-ISOBUTIRIL)-ADENOSINA (18).

Durante 15 minutos adicionou-se brometo de 2-acetoxi-isobutirilo (19,5 ml; 150 mmole; 5 eq., preparado de acor-

do com o procedimento de Russel e outros, "J. Am. Chem. Soc."; 95 (1973) p. 4016-4030 a uma suspensão de tubercidina (17, 7-deaza-adenosina; 6,66 g; 25,0 mmole, Sigma) em acetonitrilo seco (250 ml, Aldrich). Dissolveu-se o sólido em suspensão durante 5 minutos e agitou-se a mistura reacional numa atmosfera de azoto durante 22 horas a 25°C. Adicionou-se a mistura reacional a uma solução de hidrogeno-fosfato dipotássico (43,55 g; 300 mmole; 6 eq.) em água (400 ml). Depois de se agitar durante 30 minutos, extraiu-se a solução com acetato de etilo (1X400 ml e 2X200 ml). Secaram-se as camadas orgânicas combinadas sobre sulfato de magnésio e evaporou-se até à secagem para se obter 14,73 g (11,8%) de uma espuma branca. Este material apresentou uma pureza superior a 95% através de uma mancha ligeira por CCF (com detecção de UV), mas o espectro RMN mostrou a presença de um produto principal e de pelo menos um produto secundário. O espectro RMN estava consistente com o facto do produto principal ser o bromo-acetato 18.

¹H-RMN (DMSO-d₆) para o componente principal 18: 8,08 (s, 1H, H2), 7,34 (d, J = 3,7, 1H, H8) 7,12 (s largo 2H, NH₇), 6,70 (d, J = 3,7, 1H, H7), 6,32 (d, J = 3,8, 1H, H1'), 5,61 (dd, J = 2,4 e 3,8, 1H, H2'), 4,89 (dd, J = 2,4 e 4,5, 1H, H3'), 4,43 (m, 1H, H4'), 4,35 (dd, J=12 e 4, 1H, H5'a), 4,29 (dd, J = 12 e 7, 1H, H5'b), 2,08 (s, 3H, OAc), 2,00 (s, 3H, OAc), e 1,49 (s, 6H, 2CH₃).

B. PREPARAÇÃO DE 2', 3'-DIDESOXI-2',3'-DIDESIDRO-7-DEAZA-ADENOSINA (19).

Preparou-se o par zinco-cobre lavando rapidamente (tempo total decorrido cerca de 10 minutos) zinco em pó (20 g,

Mallinkrodt) com ácido clorídrico 1N (3 X 50 ml), água (2 X 50 ml), sulfato cúprico a 2% (2 X 50 ml), água (4 X 50 ml), etanol (3 X 50 ml) e éter (2 X 50 ml). Durante cada lavagem agitou-se o pó de zinco num funil revestido com vidro até se obter uma suspensão e eliminou-se o produto da lavagem por succão enquanto se minimizava a exposição do zinco ao ar. O par anterior secou-se no vácuo durante 30 minutos. Dis solveu-se o bromoacetato bruto anterior (14,63 g) em dimetilformamida seca (150 ml, Aldrich) e eliminou-se aproximadamente 25 ml de dissolvente com um evaporador rotativo $\times 45^{\circ}\text{C}$ a 2 torr (2X101325/760 Newton m^{-2}). Adicionou-se o par zinco-cobre recentemente preparado (14,63 g; cerca de 9 eq.) e agitou-se a suspensão resultante numa atmosfera de azoto a 25°C . Conforme a qualidade do par zinco-cobre, esta reacção pode apresentar um período de indução e/ou uma velocidade variável, pelo que se deixou a reacção evoluir até que a CCF (dicloro-metano/metanol/hidróxido de amónia concentrado 90:9:1 : material de partida $R_f = 0,45$ e para os produtos $R_f = 0,39$ e $0,36$) indicou que o material de partida tinha sido completamente consumido. No caso presente a reacção ficou completa em menos de 15 minutos. Decorridos 100 minutos, adicionou-se cuidadosamente bicarbonato de sódio aquoso saturado (75 ml) à mistura reacional, durante 10 minutos. Filtrou-se a mistura reacional através de um filtro e lavou-se este com metanol (2X50 ml). Evaporaram-se os filtrados combinados até à secagem e repartiu-se o resíduo entre água (150 ml) e acetato de etilo (150 ml). Extraíu-se a camada aquosa com acetato de etilo (2X100 ml) e os extractos orgânicos combinados secaram-se sobre sulfato de magnésio, concentrhou-se e secou-se no vácuo durante 1 hora.

Dissolveu-se o semi-sólido laranja escuro resultante em metanol (100 ml) e depois adicionou-se água (25 ml) e resina REXYN 201 (29 g; 4,3 meq./g, 5 eq., sob a forma de hidróxido). fez-se o refluxo da mistura reacional durante um tempo total de 210 minutos. O controlo feito por CCF (diclorometano/metanol/hidróxido de amónia concentrado 85:13:2; intermediário, $R_f = 0,49$; produto final 19; 0,24) indicou que a reacção tinha parado bruscamente após cerca de 70% de conversão, pelo que ao fim de 165 minutos se adicionou mais resina (29g). sem se arrefecer eliminou-se a resina por filtração e lavou-se com diclorometano/metanol 1:1 (2X75 ml). Evaporavam-se os filtrados combinados até à secagem e o sólido púrpura resultante recristalizou no seio de isopropanol em ebulição (150 ml), para se obter 3,778 g de olefina 19 sob a forma de agulhas branco sujo (pf 205^0 - 206^0 C). Obteve-se uma segunda colheita de 0, 631 g d eproduto (agulhas púrpura ténue, pf. 202^0 - 203^0 C) por concentração do licor-mãe até 25 ml. Ambas as colheitas (total de 4,409 g; 76%) se mostraram homogéneas por CCF e puras por RMN com a excepção de ligeiros traços de isopropanol.

1H -RMN (DMSO-d₆) : 8,07 (s, 1H, H2), 7,15 (d, J=3,6, 1H,H8), 7,12 (s largo, 1H,H1'), 7,01 (s largo, 2H, NH₂), 6,57 (d,J = 3,6, 1H, H7), 6,43 e 6,02 (d largo, J = 6,0, 1 H cada, H2' e H3'), 4,95 (t, J=6,5, 1H, 5'OH), 4,79 (m, 1H, H4'), e 3,52 (m, 2H, H5'),

4.

C. PREPARAÇÃO DE 2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (20).

Carregou-se uma garrafa de Parr de 450 ml com olefina 19 (3,80 g), etanol (76 ml), paládio em carbono a 10% (380 mg, Aldrich) e hidrogénio à pressão de 40 psi ($40 \times 6,89 \times 10^3$ Pascal). Depois de se agitar durante 4,67 horas a 25°C tinha sido absorvido hidrogénio correspondente a 14,5 psi ($14,5 \times 6,89 \times 10^3$ Pascal) e tinha cessado a libertação de hidrogénio. A CCF (duas eluições com diclorometano/metanol/hidróxido de amónio concentrado 85:13:2; material de partida 19, 0,45; produto 20, 0,48) mostrou para UV a conversão completa num único produto novo activo. Eliminou-se o catalisador por filtração através de um filtro e lavou-se com etanol. A eliminação do dissolvente do filtrado e a secagem no vácuo durante a noite originaram 3,98 g (10,4%) de didesoxinucleosido 20 sob a forma de uma espuma branca. O espectro RMN indicou que o produto era homogéneo com a excepção da presença de 8% em peso de etanol (96% do rendimento corrigido). Porções idênticas deste material resistiram à cristalização e tornaram-se extremamente higroscópicas sob secagem azeotrópica com dissolventes anidros. Por isso armazenou-se este material no vácuo durante cerca de 1 semana e utilizou-se quando o espectro RMN indicou que o material continha 5% em peso de etanol. A falta de cristalinidade e as características espectrais observadas para este produto estão de acordo com o anteriormente descrito por Robins e outros; "Can.J.Chem."; Vol. 55 (1977); p. 1259.

^1H - RMN (DMSO-d₆): 8,04 (s, 1H, H2), 7,33 (d, J=3,6, 1H, H8), 6,97 (s largo, 2H, NH₂), 6,56 (d, J=3,6, 1H, H7), 6,34 (dd, J = 5,2 e 6,4, 1H

H_{1'}), 4,96 (t, J=5,6, 1H, 5'OH), 4,33 (t, J=5,1, 0,43H, etanol OH), 4,04 (m, 1H, H4'), 3,4-3,6 (m, 2,86H, H5' e etanol CH₂), 2,33, 2,21 e 2,02 (m, 4H, H2' e H3'),, e 1,06 (t, J=7,0, 1,3H, etanol CH₃).

D. PREPARAÇÃO DE 7-IODO-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (21).

Durante duas horas aqueceu-se a 65⁰C, numa atmosfera de azoto, uma solução agitada mecanicamente de didesoxinucleóido 20 95% puro (2,95 g; 11,96 mmole), acetato de sódio anidro (4,13 g; 50,3 mmole; 4 eq.) e acetato mercúrico (3,81 g; 11,95 mmole; 1,00 eq; Fischer; 99,9%) em água (190 ml). Depois de arrefecer a suspensão de mercúrio branca resultante, para 25⁰C, adicionou-se iodo (4,79 g; 18,9 mmole; 1,6 eq.) e acetato de etilo (190 ml). Decorrida 1 hora, o mercúrio em suspensão havia sido consumido e restava uma solução púrpura límpida. decorridas 2 horas adicionou-se sulfito de sódio (6,35 g) e desapareceu a cor púrpura. Depois de se agitar durante 30 minutos fez-se borbulhar suavemente ácido sulfídrico na reacção durante 15 minutos. O sulfureto mercúrico (um colóide negro) e o iodeto 21 (um pó branco) precipitaram no seio da reacção. A precipitação completa do mercúrio (II) verificou-se por CCF fazendo o controlo por UV do desaparecimento de uma das duas manchas principais activas. Filtrou-se a mistura reacional através de um filtro e separou-se em duas camadas. Lavou-se o filtro com acetato de etilo em ebulição (9 X 100 ml) até que a CCF indicou que já não se extraía mais produto. Lavou-se cada extracto de acetato de etilo com a camada aquosa. As camadas de acetato de etilo combinadas secaram-se sobre sulfato de mag-

4.

nésio e evaporou-se até à secagem. O sólido bruto resultante ficou vermelho por exposição ao ar. Dissolveu-se este material em diclorometano/metanol 3:1 (100 ml) e adicionou-se a forma de base livre da resina de permuta de aníões AG3 X4A (5,0 g, BioRad; 2,9 meq./g secos). Fez-se borbulhar ácido sulfídrico na solução vermelha durante 10 minutos e a cor vermelha desapareceu. Eliminou-se uma ligeira turvação aquecendo suavemente e filtrou-se a solução rapidamente através de uma almofada de 2 cm (15 g) de gel de sílica. Eluiu-se o gel de sílica com mais diclorometano/metanol 3:1 (100 ml). Adicionou-se gel de sílica (50 g) ao filtrado e fez-se borbulhar ácido sulfídrico durante 10 minutos. Eliminou-se o dissolvente desta mistura com um evaporador rotativo e "secou-se" o gel de sílica fazendo a evaporação conjunta com clorofórmio (200 ml). Com este gel de sílica carregou-se rapidamente uma coluna de gel de sílica (500 g) que tinha sido desgasificada com uma corrente de azoto. A eluição numa atmosfera de azoto com 5% (6 litros) e 10% (4 litros) de metanol em ebuição em diclorometano originou 2,92 g (64%) de iodeto 21, sob a forma de um pó branco e 456 mg (7,5%) de 7,8-di-iodo-2',3'-didesoxi-7-deaza-adenosina menos polar. A recristalização do produto principal no seio de acetato de etilo em ebuição (200 ml) originou 2,626g de agulhas brancas (pf 158⁰-160⁰ C). A concentração dos licores-mãe para 10 ml originou uma segunda colheita de 0,391 g de agulhas vermelho claro (pf 156⁰-158⁰ C). Ambas as colheitas se apresentaram homogéneas de acordo com o espectro RMN e por CCF e em conjunto o rendimento global foi de 64% de iodonucleosido 21 a partir da olefina 19.

4.

^1H -RMN (DMSO-d₆): 8,09 (s, 1H, H2), 7,67 (s, 1H, H8), 6,65 (s largo, 2H, NH₂), 6,34 (dd, J = 4,4 e 6,8, 1H, H1'), 4,95 (t, J = 5,5, 1H, 5'OH), 4,04 (hept aparente, J = 3,5, 1H, H4'), 3,59 e 3,49 (m, 2H, H5'), 2,30, 2,28 e 2,00 (m, 4H, H2' e H3').

E. PREPARAÇÃO DE 7-(3-TRIFLUOROACETAMIDO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDEOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (52)

Durante 90 minutos fez-se o acoplamento do iodeto 21 (720,3 mg; 2,00 mmole) com N-propargil-trifluoroacetamida seguindo o procedimento normalizado apresentado no exemplo 1C. A chromatografia com 7% de metanol em diclorometano originou 705,8 mg (92%) do produto de acoplamento 52 sob a forma de um pó branco sujo que se apresentou homogéneo, de acordo com o espectro RMN e por CCF. A recristalização no seio de acetato de etilo em ebulação (10 ml) originou 372 mg de micro-cristais brancos (pf 169⁰-171⁰ C).

D ^1H -RMN (DMSO-d₆): 10,1 (t distorcido, 1H, NHTFA), 8,10 (s, 1H, H2), 7,78 (s, 1H, H8), 6,0-7,5 (s muito largo, 2H, NH₂), 6,34 (dd, J = 4,5 e 7,0, 1H, H1'), 4,98 (t, J = 5, 1H, 5'OH), 4,31 (s ligeiramente largo, 2H, -CH₂N-), 4,10 (hept aparente, J = 3,5, 1H, H4'), 3,60 e 3,40 (m, 2H, H5'), 2,37, 2,18 e 2,00 (m, 4H, H2' e H3').

CCF (diclorometano/metanol/hidróxido de amónia concentrado 90:9:1; UV) iodeto de partida 21, R_f=0,36; produto 52, 0,26).

4.

F. PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 7-(3-AMINO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (51).

Converteu-se o nucleosido de alcinil-amino 52 (1,00 mmole) no correspondente 5' -trifosfato e eliminou-se o grupo trifluoro-acetilo, seguindo o procedimento geral descrito no exemplo 1E. Após a adição de uma segunda aliquota de oxicloreto de fósforo, agitou-se a solução durante 120 minutos. Admitindo para o produto um coeficiente de absorção igual ao do material de partida (12.700), o rendimento do trifosfato 51, baseado na absorção a 279,5 nm, foi de 40%.

¹H-RMN (D_2O): 7,97 (s, 1H, H2), 7,80 (s, 1H, H8), 6,33 (m, 1H, H1'), 4,44 (m, 1H, H4'), 4,27 (m, 1H, H5'a), 4,14 (m, 1H, H5'b), 4,11 (s largo, 2H, -CH₂-), 2,6-2,0 (m, 4H, H2' e H3'), mais os picos do íão contrário (trietyl-amônio). ³¹P-RMN (D_2O): -8,59 (d largo, J = 20, 1P), -9,56 (d, J = 20, 1P) , e -21,38 (m, 1P). UV (pH 8,2 Tris aq: máximos a 238 e 279,5 nm.

EXEMPLO 5

UMA SEGUNDA PREPARAÇÃO DE 7-IODO-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (21).

(O composto 21 é um intermediário preparado e utilizado no exemplo 4).

A. PREPARAÇÃO DE 6-CLORO-2-METILTIO-9-(2-DESOXI- β -D-RIBOFURANO-SIL)-7-DEAZAPURINA (23).

Adicionou-se metanol (210 ml) e hidróxido de amónia concentrado (210 ml) a uma solução de 6-cloro-2-metiltio-9-(3,5-di-0-p-toluoil-2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-7-deazapurina (22, 26,8 g, preparado conforme descrito por Kazamierczuk e outros; "J. Am. Chem. Soc."; Vol. 106 (1984) p.6379 em diclorometano (210 ml). Agitou-se a mistura resultante à temperatura ambiente durante 5 dias e depois evaporou-se até à secagem. Secou-se o resíduo por evaporação em conjunto com etanol. Dissolveu-se o produto bruto em diclorometano e, deixada a solução em repouso observou-se a precipitação de cristais incolores.

Recolheu-se o precipitado e lavou-se cuidadosamente com éter, para se obter 14,5 g (79,1%) de diol 23 (pf com decomposição 190°-192° C).

^1H -RMN (DMSO-d₆): 2,26 e 2,55 (m, 2H, H_{2'}), 2,57 (s, 3H, SCH₃), 3,54 (m, 2H, H_{5'}), 3,84 (m, 1H, H_{3'}), 4,37 (m, 1H, H_{4'}), 4,95 (m, 1H, OH), 5,34 (m, 1H, OH), 6,57 (m, 1H, H_{1'}), 6,63 (m, 1H, H₇), 7,80 (m, 1H, H₈).

Estes dados obtiveram-se a partir de uma porção diferente de diol 23 preparado conforme atás descrito.

B. PREPARAÇÃO DE 6-CLORO-2-METILTIO-9-(5-O-TRIFENILMETIL-2-DESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (24).

Secou-se o diol 23 (14,5 g) por evaporação

conjunta com piridina seca. Adicionou-se cloreto de trifenil-metilo (16 g), 4-(dimetilamino)-piridina (600 mg), e trietilamina (8,0 ml) a uma solução do diol seco em piridina seca (200 ml). Depois de se agitar a mistura reaccional a 65°C numa atmosfera de azoto durante 6 horas, adicionou-se mais cloreto de trifenilmetilo (2,0 g) e trietilamina (1,0 ml) e manteve-se o aquecimento durante 17 horas. Depois de arrefecer adicionou-se metanol (3 ml) e evaporou-se a mistura reacional até à secagem. Repartiu-se o resíduo entre diclorometano e ácido clorídrico 0,3 N. Lavou-se a camada orgânica com bicarbonato de sódio aquoso e com uma solução salina, secou-se sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secagem. A cromatografia do produto bruto resultante em gel de sílica com 1% e 1,5% de metanol em diclorometano originou 22,7 g (88,6%) de éter mono-tritílico 24 sob a forma de um sólido vidrado.

¹H-RMN (CDCl_3): 2,48 e 2,60 (m, 2H, H₂'), 2,59 (s, 3H, SCH₃), 3,40 (m, 2H, H₅'), 4,08 (m, 1H, H₃'), 4,61 (m, 1H, H₄'), 6,43 (m, 1H, H₇), 6,68 (m, 1H, H₁'), 7,2-7,5 (m, 16H, tritilo H e H₈).

Estes dados obtiveram-se a partir de uma porção diferente de 24 preparado conforme atrás descrito.

C. PREPARAÇÃO DE 6-CLORO-2-METILTIO-9-(5-O-TRIFENILMETIL-2,3-DIDESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (25).

Adicionou-se 4-(dimetilamino)-piridina (16,5 g) e clorotionocarbonato de fenilo (13,5 ml) a uma solução de éter

L

tritílico 24 em diclorometano seco (300 ml). Depois de se agitar a mistura reaccional à temperatura ambiente numa atmosfera de azoto durante 2,25 horas, adicionou-se diclorometano (200 ml). Lavou-se a solução com ácido clorídrico 0,5 N (700 ml), com hidróxido de sódio 0,5 N (700 ml) e com uma solução salina. Secou-se a camada orgânica sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secagem.

Dissolveu-se o tiocarbonato bruto resultante em tolueno seco (450 ml) e aqueceu-se a solução para proporcionar o refluxo suave. Adicionou-se azo-iso-bis—butironitrilo (600 mg) e hidreto de tri-n-butil-estanho (17,7 ml). depois de se agitar ao refluxo numa atmosfera de azoto durante 15 minutos adicionou-se mais hidreto de tri-n-butil-estanho (2,0 ml) e fez-se o refluxo da mistura reaccional durante mais 15 minutos. Depois de arrefecer diluiu-se a mistura reaccional com éter (200 ml) e lavou-se com fluoreto de potássio aquoso a 10% (500 ml), com hidróxido de potássio 0,75 N (500 ml) e com uma solução salina. Depois de se secar sobre sulfato de sódio e de se concentrar, a cromatografia do produto bruto resultante, em gel de sílica, com diclorometano/éter 2:1 e com diclorometano originou 10,1 g de didesoxinucleóside 25. As fracções impuras combinaram-se e nova cromatografia originou mais de 3,76 g de produto puro. Combinaram-se estes produtos para proporcionar 13,9 g (63%) do produto 25 sob a forma de um sólido incolor (pf 140⁰-142,5⁰C).

¹H-RMN (CDCl_3): 2,11, 2,36, e 2,46 (m, 4H, H^{2'} e H^{3'}), 2,60 (s 3H, SCH₃), 3,33 (d aparente, J = 4, 2H, H^{5'}), 4,32 (m, 1H, H^{4'}), 6,39 (d, J=3,7, 1H, H⁷), 6,52 (dd, J=6,7 e 3,7, 1H, H^{1'}), 7,25 e 7,45 (m, 15H,

4.

tritilo H), 7,32 (d, 1H, J = 3,7, H8).

Estes dados obtiveram-se a partir de uma porção diferente de 25 preparado conforme atrás descrito.

D. PREPARAÇÃO DE 6-CLORO-2-METILTIO-9-(2',3'-DIDESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (26).

Adicionou-se ácido trifluoroacético (10 ml) a uma solução de éter tritílico 25 (7,58 g) em metanol/diclorometano 1:1 (100 ml) e agitou-se a solução a 25°C numa atmosfera de azoto durante 17 horas. Repartiu-se a mistura reacional entre diclorometano (500 ml) e bicarbonato de sódio aquoso, e extraíu-se novamente a camada aquosa com diclorometano. As camadas orgânicas combinadas secaram-se sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secagem. A cromatografia do resíduo em gel sílica com 0% e 5% de metanol em diclorometano proporcionou 4,07 g (97,1%) de nucleósido 26 sob a forma de um sólido vídrado espesso incolor.

^1H -RMN (CDCl_3): 2,16,2,26, e 2,50 (m, 4H, H2' e H3'), 2,63 (s, 3H, SCH_3), 2,76 (s largo, 1H, OH), 3,67 e 3,93 (m, 2H, H5'), 4,27 (m, 1H, H4'), 6,38 (dd, J=6,7 e 5,2 Hz, 1H, H1'), 6,51 (d, J = 3,7 Hz, 1H, H7), 7,26 (d, 1H, J = 3,7 Hz, H8).

Estes dados obtiveram-se a partir de uma porção diferente de 26 preparado conforme atrás descrito.

E. PREPARAÇÃO DE 2',3'-DIDESOXI-2-METILTIO-7-DEAZA-ADENOSINA (27)

Destilou-se amônia (10 g) para uma solução de cloreto 26 (1,83 g) em metanol (50 ml) numa bomba revestida com vidro. Aqueceu-se a solução numa autoclave a 100⁰C durante 15 horas. Depois de arrefecer evaporou-se a mistura reacional até à secagem. A purificação do produto bruto resultante sobre gel de sílica com 0%, 3% e 5% de metanol em diclorometano originou 1,27 g (80,4%) de deaza-adenosina 27 sob a forma de um sólido incolor (pf 184⁰-185⁰ C).

¹H-RMN (DMSO-d₆): 2,01, 2,21, e 2,39 (m, 4H, H2' e H3'), 2,45 (s, 3H, SCH₃), 3,50 (m, 2H, H5'), 4,02 (m, 1H, H4'), 4,83 (t, J = 5,5, 1H, 5'OH), 6,32 (dd, J=7 e 4,5, 1H, H1'), 6,50 (d, J=3,7, 1H, H7), 7,07 (s largo, 2H, NH₂), 7,20 (d, 1H, J=3,7, H8).

F. PREPARAÇÃO DE 2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (20).

Fez-se o refluxo de uma mistura de 600 mg de 27 em níquel de Raney em excesso (Aldrich, lavagem prévia com água e metanol), numa atmosfera de azoto até que a CCF indicou o desaparecimento do material de partida (6 horas). Filtrou-se a solução quente através de um filtro e recolheu-se o níquel de Raney e lavou-se bem com metanol. Evaporou-se os filtrados combinados para se obter 424 g (84,9%) de 20 sob a forma de um sólido vidrado incolor idêntico ao do material preparado no exemplo 4C.

G. PREPARAÇÃO DE 7-IODO-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (21).

Iodou-se didesoxi-7-deaza-adenosina 20 seguindo o procedimento apresentado no exemplo 4D.

EXEMPLO 6

UMA TERCEIRA PREPARAÇÃO DE 7-IODO-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-
-ADENOSINA (21).

(O composto 21 é um intermediário preparado e utilizado no exemplo 4).

A. PREPARAÇÃO DE 6-CLORO-9-(2-DESOKSI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (29).

Adicionou-se uma solução de hidróxido de amônia concentrado (100 ml) em metanol (175 ml) a uma solução de 6-cloro-9-(3,5-di-O-p-toluoil-2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-7-deazapurina (28; 10,0 g ; preparada conforme descrito por Z. Kazimierczuk e outros; "J. Amer. Chem. Soc."; Vol. 106 (1984) p. 6379) em diclorometano (100 ml). Depois de se agitar a mistura resultante a 25°C durante 24 horas, adicionou-se mais hidróxido de amônia concentrado (50 ml). Depois de se agitar durante um total de 5 dias evaporou-se a mistura reaccional até à secagem e evaporou-se o produto bruto em conjunto com etanol. Dissolveu-se o resíduo em diclorometano e o produto desejado cristalizou. A filtração e a secagem proporcionaram 4,90 g (92%)

de nucleósido 29 sob a forma de cristais incolores (pf 155,5⁰-158,5⁰C).

H-RMN (DMSO-d₆): 2,30 e 2,55 (m, 2H, H₂'), 3,58 (m, 2H, H₅'), 3,85 (m, 1H, H₃'), 4,40 (m, 1H, H₄'), 4,97 (m, 1H, OH), 5,35 (m, 1H, OH), 6,65 (m, 1H, H₁'), 6,75 (d, 1H, H₇), 8,00 (m, 1H, H₈), 8,65 (s, 1H, H₂).

Estes dados obtiveram-se a partir de uma porção diferente de 29 preparada conforme atrás descrito.

B. PREPARAÇÃO DE 6-CLORO-9-(5-O-TRIFENIL-METIL-2-DESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA(30).

Secou-se o nucleosido 29 (2,5 g) por evaporação conjunta com piridina seca. Dissolveu-se o resíduo novamente em piridina seca (40 ml) e adicionou-se cloreto de trifenilmetilo (2,5 g), 4-(dimetilamino)-piridina (120 mg) e trietilamina (1,6 ml). Agitou-se a mistura reaccional a 65⁰C durante 4 horas numa atmosfera de azoto. Adicionou-se mais cloreto de trifenilmetilo (1,0 g) e trietilamina (0,6 ml) e agitou-se a mistura a 75⁰C durante 18 horas. Depois de arrefecer adicionou-se metanol (2 ml) e evaporou-se a mistura reaccional até à secagem. Repartiu-se o resíduo entre diclorometano e ácido clorídrico 0,5 N. Lavou-se a camada orgânica com bicarbonato de sódio aquoso e com uma solução salina, secou-se sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secagem. A cromatografia em gel de sílica com 0 %, 1,5% e 3% de metanol em diclorometano proporcionou 2,26 g (48%) de éter tritílico 30 sob a forma de um sólido vidrado.

l.

^1H -RMN (CDCl_3): 2,46 e 2,65 (m, 2H, H_{2'}), 3,40 (m, 2H, H_{5'}), 4,10 (m, 1H, H_{3'}), 4,65 (m, 1H, H_{4'}), 6,55 (d, 1H, H₇), 6,72 (m, 1H H_{1'}), 7,2-7,5 (m, 16H, tritilo H e H₈), e 8,60 (s, 1H, H₂).

C. PREPARAÇÃO DE 6-CLORO-9-(5-O-TRIFENILMETIL-2-DESOXI-3-TIONO-CARBOFENOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (30a).

Adicionou-se 4-(dimetilamino)-piridina (1,35 g) e clorotionocarbonato de fenilo (1,20 ml) a uma solução de éter trítílico 30 em diclorometano seco (30 ml). Depois de se agitar a mistura reaccional numa atmosfera de azoto durante 2 horas a 25⁰C adicionou-se mais diclorometano (20 ml) e lavou-se a solução com áci do clorídrico 0,5N, com hidróxido de sódio 0,5 N e com uma solução salina. Secou-se a camada orgânica sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secagem. A trituração do resíduo no seio de diclorometano/éter originou 1,53 g (76%) de tiocarbonato 30a sob a forma de cris tais incolores (pf 186,5⁰-188,5⁰C).

^1H -RMN (CDCl_3): 2,85 e 3,00 (m, 2H, H_{2'}), 3,55 (m, 2H, H_{5'}), 4,50 (m, 1H, H_{4'}), 6,00 (m, 1H, H_{3'}), 6,60 (d, 1H, H₇), 6,85 (m, 1H, H_{1'}), 7,1-7,5 (m, 20H, tritilo e fenilo H), 7,50 (d, 1H, H₈), e 8,60 (s, 1H, H₂).

D. PREPARAÇÃO DE 6-CLORO-9-(5-O-TRIFENILMETIL-2,3-DIDESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (31).

Aqueceu-se a 110⁰C uma solução de tiocarbonato 30a (1,2 g), azo-iso-bis-butironitrilo (50 mg) e hidreto de tri-n-

L

-butil-estanho (0,60 ml) em tolueno seco (50 ml) numa atmosfera de azoto durante 15 minutos. Depois de arrefecer diluiu-se a mistura reaccional com 50 ml de éter e lavou-se com fluoreto de potássio aquoso a 10% (50 ml) e com uma solução salina. Secou-se a camada orgânica sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secagem. A cromatografia do produto bruto resultante sobre gel de sílica com 0% e 1,5% de metanol em diclorometano originou 0,84 g (92%) de didesoxinucleósido 31 sob a forma de um sólido incolor (pf 60⁰-63,5⁰C).

¹H-RMN (CDCl_3): 2,11, 2,36, e 2,50 (m, 4H, H2' e H3'), 3,37 (m, 2H, H5'), 4,35 (m, 1H, H4'), 6,50 (d, J=3,7, 1H, H7), 6,58 (dd, 1H, H1'), 7,25 e 7,45 (m, 15H, tritílo H), 7,55 (d, 1H, J = 3,7, H8), e 8,60 (s, 1H, H2').

E. PREPARAÇÃO DE 6-CLORO-9-(2,3-DIDESOXI-, β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (31a).

Adicionou-se ácido trifluoroacético (1,5 ml) a uma solução de éter tritílico 31 (700 mg) em metanol/diclorometano 1:1 (20 ml). Depois de se agitar numa atmosfera de azoto a 25⁰C durante 17 horas adicionou-se bicarbonato de sódio (1,5 g) e agitou-se a mistura durante 30 minutos. Filtrou-se a mistura reaccional e evaporou-se até à secagem. A cromatografia do produto bruto resultante em gel de sílica com 0% e 2% de metanol em diclorometano originou 300 mg (84%) de álcool 31a sob a forma de um sólido vidrado incolor.

¹H-RMN (CDCl_3): 2,20, 2,40 e 2,65 (m, 4H, H_{2'} e H_{3'}), 3,65 e 4,00 (m, 2H H_{5'}), 3,95 (s largo, 1H, OH), 4,25 (m, 1H, H_{4'}), 6,28 (dd, 1H, H_{1'}), 6,62 (d, J = 4, 1H, H₇), 7,40 (d, 1H, J = 4, H₈), e 8,65 (s, 1H, H₂).

F. PREPARAÇÃO DE 6-CLORO-9-(5-ACETOXI-2,3-DIDESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (32).

Adicionou-se anidrido acético (2,0 mmole) a uma solução de álcool 31a (284 mg) em piridina seca (10 ml). Depois de se agitar a solução durante 1,25 horas a 25°C adicionou-se metanol (10 ml). Depois de se agitar durante mais 30 minutos evaporou-se a mistura reacional até à secagem. Dissolveu-se o resíduo em diclorometano e lavou-se esta solução com ácido clorídrico 1N (2X) e com uma solução salina (1X). secou-se a camada orgânica sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secagem para se obter 295 mg (89%) de acetato bruto 32 sob a forma de um sólido vidrado incolor.

¹H-RMN (CDCl_3): 2,07 (s, 3H, acetilo), 2,20, 2,45, e 2,55 (m, 4H, H_{2'} e H_{3'}), 4,25 e 4,35 (m, 2H, H_{5'}), 4,40 (m, 1H, H_{4'}), 6,55 (dd, 1H, H_{1'}) 6,65 (d, 1H, H₇), 7,50 (d, 1H, H₈), e 8,60 (s, 1H, H₂).

G. PREPARAÇÃO DE 6-CLORO-7-IODO-9-(5-O-ACETIL-2,3-DIDESOXI- β -D-RIBOFURANOSIL)-7-DEAZAPURINA (33)

Adicionou-se uma solução de monocloreto de iodo (340 mg) em diclorometano (cerca de 1 ml) a uma solução de ace-

4.

tato 32 (200 mg) em diclorometano seco (20 ml). Depois de se agitar a 25°C durante 3 horas repartiu-se a mistura reaccional entre diclorometano e hidrossulfito de sódio aquoso. Lavou-se a camada orgânica com bicarbonato de sódio aquoso e com uma solução salina, secou-se sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secagem. tritou-se o resíduo no seio de diclorometano/éter para se obter 135 mg (47%) de cristais incolores (pf 132,5°-134°).

¹H-RMN (CDCl_3): 2,10, 2,40 e 2,55 (m, 4H, H_{2'} e H_{3'}), 2,17 (s, 3H, COCH₃), 4,27 e 4,37 (m, 2H, H_{5'}), 4,40 (m, 1H, H_{4'}), 6,55 (dd, 1H, H_{1'}), 7,72 (s, 1H, H₈), e 8,60 (s, 1H, H₂).

H. PREPARAÇÃO DE 7-IODO-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZA-ADENOSINA (21).

Adicionou-se amónia (4 g) a uma solução de 125 mg de cloreto 33 em metanol (20 ml) numa bomba revestida com vidro. Aqueceu-se a bomba numa autoclave a 100°C durante 3 horas. Depois de arrefecer evaporou-se a mistura reaccional até à secagem. Dissolveu-se o resíduo em acetato de etilo quente e filtrou-se a solução quente através de um filtro. Depois de se evaporar o filtrado até à secagem tritou-se o resíduo no seio de éter, para se obter 85 mg de produto 21 ligeiramente impuro, sob a forma de cristais incolores. A purificação posterior deste material por CCF preliminar, em gel de sílica com 5% de metanol em diclorometano, originou 67 mg (63%) de iodeto 21 sob a forma de um sólido incolor. Este material era idêntico ao que se preparou no exemplo 4D.

EXEMPLO 7

PREPARAÇÃO DE 7-IODO-2',3'-DIDESOXI-7-DEAZAINOSINA (53)

(O composto 53 é um exemplo da estrutura 4 em que Het representa 7-deaza-hipoxantina (1)).

Adicionou-se água (18 ml), gota a gota a uma suspensão de deaza-adenosina 21 (720,3 mg; 2,00 mmole) em ácido acético glacial (2,0 ml) numa atmosfera de argon para se obter uma solução límpida. Adicionou-se nitrito de sódio sólido (1,38 g; 20,0 mmole; 10 eq.) através de uma corrente de argon, em pequenas quantidades, durante 10 minutos. Agitou-se mecanicamente a mistura reacional turva resultante, numa atmosfera de argon e formou-se gradualmente um precipitado gomoso. decorridas 18 horas, filtrou-se a mistura e lavou-se o precipitado cuidadosamente com acetato de etilo (100 ml) e com água (cerca de 10 ml). Os filtrados combinados repartiram-se e extraíu-se a camada aquosa com acetato de etilo (2X50 ml). As camadas orgânicas combinadas secaram-se sobre sulfato de magnésio e evaporou-se até à secagem. De acordo com a CCF, tanto o precipitado como os extractos de acetato de etilo eram constituídos pelo produto 53 e estavam contaminados com menos do que 5% de produto 21 que não reagiu. Dissolveram-se ambas as porções de produto em metanol/diclorometano 1:1, combinou-se e evaporou-se sobre gel de sílica (7 g). Fez-se a evaporação conjunta do gel de sílica com clorofórmio (50 ml) e colocou-se numa coluna de gel sílica (50 g). A eluição com 8% de

L.

metanol em diclorometano originou 558,3 mg (78%) de deazainosina 53 sob a forma de um sólido amarelo claro. Obtiveram-se duas colheitas de agulhas brancas por recristalização deste material no seio de isopropanol em ebulação. Estas agulhas apresentaram um ponto de fusão com decomposição variável entre 200⁰C e 210⁰C. Verificou-se que os produtos cromatografados e recristalizados eram homogéneos por CCF e por RMN com a exceção da presença de isopropanol (5% molar).

¹H-RMN (DMSO-d₆): 12,04 (s largo, 1H, H1), 7,93 (s, 1H, H2), 7,56 (s, 1H, H8), 6,29 (dd, J = 4,0 e 6,8, 1H, H1'), 4,94 (t, J=5,0, 1H, 5'OH), 4,04 (hept aparente, J = 3,5, 1H, H4'), 2,36, 2,18 e 1,99 (m, 4H, H2' e H3').

EXEMPLO 8

PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 5-(3-AMINO-1-PROPINIL)-2'- -DESOXICITIDINA (54).

(O composto 54 é um exemplo de um nucleotido de alcinilamino (I) em que R₁ representa um grupo -CH₂-, Het representa citosina (i), R₂, R₃, R₇ e R₈ representam átomos de hidrogénio, R₆ representa um grupo OH, e R₅ representa o grupo P₃O₉H³⁻).

A. PREPARAÇÃO DE 5-IODO-2'-DESOXICITIDINA (55).

Durante 14,5 horas fez-se o refluxo de uma solução de mono-hidrato de 2'-desoxicitidina (1,226 g; 5,00 mmole,

Aldrich) e acetato mercúrico (1,753 g; 5,5 mmole; 1,1 eq., Fischer) em metanol (20 ml). A suspensão branca resultante diluiu-se com metanol (30 ml) e depois adicionou-se diclorometano (50 ml) e iodo (1,522 g; 6,00 mmole; 1,2 eq.). Depois de se agitar durante 60 minutos a solução púrpura resultante tinha perdido a côr e o mercúrio que não reagiu ainda era visível sob a forma de uma suspensão branca. Decorridos 100 minutos e decorridos 240 minutos adicionou-se mais iodo (0,381 g; 1,5 mmole; 0,3 eq e 0,122 g; 0,50 mmole; 0,1 eq. respectivamente). Decorridos um tempo total de 5 horas a mistura reaccional era púrpura e límpida. Adicionou-se resina AG3 X4A sob a forma de base livre (5,17 g; 2,9 meq./g 3 eq., Bio-rad) e depois fez-se borbulhar ácido sulfídrico na mistura reaccional durante 5 minutos. A precipitação completa do mercúrio (II) verificou-se por CCF. Filtrou-se a mistura reaccional com um filtro e lavou-se este com metanol/diclorometano 1:1. Adicionou-se gel de sílica (5 g) aos filtrados combinados e evaporou-se a mistura reaccional até à secagem. Fez-se a evaporação conjunta do gel de sílica com clorofórmio (50 ml) e colocou-se numa coluna de gel sílica (50 g). A eluição com 15%, 20% e 30% de metanol em diclorometano originou 1,378 g (78%) de iodocitidina 55 sob a forma de um pó branco. A recristalização no seio de metanol em ebullição (35 ml) originou após secagem no vácuo durante a noite, 0,953 g de agulhas brancas (pf 179⁰-180⁰C). A concentração dos licores-mãe para 10 ml originou uma segunda colheita de 0,140 g de agulhas amarelo claro (pf 172⁰- 174⁰C). Com excepção de uns traços de metanol, ambas as colheitas (rendimento total de 62%) apresentaram-se homogéneas, de acordo com CCF e com RMN.

7

^1H -RMN (DMSO-d₆): 8,28 (s, 1H, H6), 7,8 e 6,6 (s largo, 2H NH₂), 6,08 (t, J=6,3, 1H, H1'), 5,20 (d, J=4,1H, 3'OH), 4,90 (t, J= 5, 1H, 5'OH), 4,20 (m, 1H, H4'), 3,77 (q distorcido, 1H, H3'), 3,60 e 3,54 (m, 1H, H5'), 2,12 e 1,98 (m, 1H, H2').

CCF (diclorometano/metanol/hidróxido de amónia concentrado 75:20:5; UV): material de partida R_f= 0,15; produto 55, 0,33; mercúrio (II), 0,54.

B. PREPARAÇÃO DE 5-(3-TRIFLUOROACETAMIDO-1-PROPINIL)-2'-DESOXI CITIDINA (56).

Durante 4 horas fez-se o acoplamento de iodeto 55 (353,1 mg; 1,00 mmole) com N-propargil-trifluoroacetamida, seguindo o procedimento geral apresentado no exemplo 1C. A cromatografia do produto bruto com um gradiente de 0-20% de metanol em diclorometano originou 3,84 g (10,2%) de pó branco após secagem no vácuo durante a noite. Verificou-se por CCF que este material era homogéneo, mas reteve o dissolvente persistentemente. A recristalização deste pó no seio do isopropanol em ebulição (10 ml) e o arrefecimento até -20°C originou 299,6 mg (74%) de nucleosido de alcinilamino 56 sob a forma de agulhas brancas (pf 168°-170°C). O espectro RMN mostrou que o produto recristalizado era homogéneo e que os cristais continham 0,5 moléculas de isopropanol por molécula de produto 56.

^1H -RMN (DMSO-d₆): 9,96 (s largo, 1H, NHTFA), 8,15 (s, 1H, H6), 7,83 e 6,86 (s largo, 2H, NH₂) 6,10 (t, J = 6,5, 1H, H1'), 5,21 (d, J=

L

= 4,5, 1H, 3'OH), 5,06 (t, J = 5, 1H, 5'OH), 4,35 (d, J = 4, 0,5H, isopropanol OH), 4,28 (s largo, 2H, -CH₂N-), 4,20 (hex aparente J = 3,5,1H, H4'), 3,79 (m, 1,5H, H3' e isopropanol CH), 3,56 (m, 2H, H5'), 2,13 e 1,97 (m, 1H, H2'), e 1,04 (d, J = 6, 3H, isopropanol CH₃).

CCF (diclorometano/metanol/hidróxido de amónia concentrado 85:13:2; duas eluições; UV); iodeto de partida 55, R_f = 0,31; produto 56, 0,27.

C. PREPARAÇÃO DE 5'-TRIFOSFATO DE 5-(3-AMINO-1-PROPINIL)-2'-DESOXICITIDINA (54).

Converteu-se o nucleosido de alcinilamino 56 (0,275 mmole) no correspondente 5'-trifosfato e eliminou-se o seu grupo trifluoroacetilo seguindo o procedimento geral apresentado no exemplo 1E. Após a adição da segunda aliquota de oxicloreto de fosforo, deixou-se a fosforilação evoluir durante 3,5 horas. Admitindo para o produto um coeficiente de absorção igual ao do material de partida (8 780), o rendimento de trifosfato 54, baseado na sua absorção de UV a 293 nm foi de 17%.

EXEMPLO 9

PREPARAÇÃO DE 5-(3-TRIFLUOROACETAMIDO-1-PROPINIL)-2'-DESOXIURIDINA (57)

(o composto 57 é um exemplo de um nucleotido de alcinilamino (I) em que R₁ representa um grupo -CH₂- , R₂ representa um grupo COCF₃, Het representa um uracilo (h), R₃, R₅, R₇ e R₈ representam átomos de hidrogénio e R₆ representa um grupo OH).

4.

Durante 4 horas fez-se o acoplamento de 5-iodo-2'-desoxiuridina (7,08 g; 20,0 mmole, Aldrich) com N-trifluoroacetilpro-pargilamina, seguindo o procedimento geral apresentado no exemplo 1C, com a excepção de se ter efectuado a reacção com uma concentração 2,5 vezes superior ao usual. A cromatografia do produto bruto em gel de sílica (500 g) com 10-20% de metanol em diclorometano originou 3,50 g (46%) de nucleóside de alcinilamino 57 sob a forma de um sólido acastanhado. De acordo com RMN e com CCF este material apresentou uma pureza superior a 95%, com a excepção da presença de metanol (cerca de 50% molar) que não se eliminou por secagem no vácuo.

^1H -RMN (DMSO-d_6): 11,63 (s, 1H, H3), 10,06 (t distorcido, 1H, NHTFA), 8,19 (s, 1H, H6), 6,10 (t aparente, 1H, H1'), 5,23 (d, $J=4,1\text{Hz}$, 3'OH), 5,07 (t, $J = 5, 1\text{Hz}$, 5'OH), 4,23 (m, 3H, - CH_2- e H4'), 3,8 (q aparente, $J = 4, 1\text{Hz}$, H3'), 3,58 (m, 2H, H5') e 2,12 (m, 2H, H2').

EXEMPLO 10

PREPARAÇÃO DE 5-(5-TRIFLUOROACETAMIDO-1-PENTINIL)-2',3'-DIDESOXIURIDINA (58)

O composto 58 é um exemplo da estrutura 5 em que Het representa uracilo (h) e R_1 representa um grupo $-(\text{CH}_2)_3-$.

A. PREPARAÇÃO DE 5-TRIFLUOROACETAMIDO-1-PENTINO (59).

Libertou-se hidreto de sódio (dispersão a 60% em óleo, Alfa) do óleo lavando-o total, cuidadosa e rapidamente

com petano e depois secando-o no vácuo. Adicionaram-se aproximadamente 20 porções de hidreto de sódio livre de óleo (4,40 g; 0,110 mole, 1,1 eq.), durante 25 minutos, a uma solução de 5-cloropentino (10,6 ml; 0,100 mole; 1,0 eq.), trifluoroacetamida (14,13 g; 0,125 mole; 1,25 eq.) de iodeto de sódio (14,99 g; 0,100 mole; 1,0 eq.) em dimetilformamida seca (250 ml, Aldrich). Agitou-se a mistura reacional a 25°C durante 4,5 horas e a 60°C durante 21 horas. Depois de arrefecer adicionou-se a mistura reacional a uma solução de di-hidrogeno-fosfato de potássio (43,5 g; 0,250 mole; 2,0 eq.) em água (500 ml). Extraíu-se esta solução com pentano (2 X 500 ml) e com éter (3 X 500 ml). As camadas orgânicas combinadas lavaram-se com água (1 X 100 ml), secaram-se sobre sulfato de magnésio e concentrhou-se num evaporador rotativo. A destilação fraccional dupla através de uma coluna de Vigreux de 20 cm proporcionou 8,09 g (45%) de 5-trifluoroacetamido-1-pentino (58) sob a forma de um líquido instável incolor (pe 68°-69°C a 13 torr (13X101325/760 Newton m⁻²).

¹H-RMN (CDCl₃): 6,77 (s largo, 1H, NHTFA), 3,53 (q, J = 6,7 e 2,7, 2H, -CH₂NHTFA), 2,31 (td, J = 6,7 e 2,7, 2H, HCCCH₂-), 2,04 (t, J = 2,7, 1H, HCCCH₂-), e 1,83 (quinteto, J = 6,7, 2H, -CH₂CH₂CH₂-).

B. PREPARAÇÃO DE 5-(5-TRIFLUOROACETAMIDO-1-PENTINIL)-2',3'-DIDESOXIURIDINA (58).

Durante 4 horas fez-se o acoplamento de 5-trifluoroacetamido-1-pentino (59) a 5-iodo-2',3'-didesoxiuridina (47, preparada conforme descrito no exemplo 2A), de acordo com o procedi-

4.

mento geral descrito no exemplo 1C. A cromatografia em gel de sílica (100 g) com um gradiente de 0-5% de metanol em diclorometano originou 647,7 mg de nucleosido de alcinilamino 58 sob a forma de uma espuma castanha clara. Verificou-se por CCF e por RMN que este material era homogéneo com a exceção da presença de, aproximadamente, 16% molar de dimetilformamida. Fazendo a correção devida à presença de dimetilformamida, o rendimento do produto desejado foi de 80%.

¹H-RMN (DMSO-d₆): 11,52 (s, 1H, H3), 9,47 (t distorcido, 1H, NHTFA), 5,90 (q, 1H, H1'), 5,12 (t, 1H, 5'OH), 4,04 (m, 1H, H4'), 3,71 e 3,52 (m, 2H, 5'H), 3,30 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₂NHTFA), 2,40 (t, 2H, -CH₂CH₂CH₂NHTFA), 2,23, 2,01 e 1,85 (m, 4H, H2' e H3'), e 1,73 (quinato, 2H, -CH₂CH₂CH₂NHTFA).

EXEMPLO 11

PREPARAÇÃO DE 5-(12-TRIFLUOROACETAMIDO-1-DODECINIL)-2',3'- -DIDESOXIURIDINA (60).

O composto 60 é um exemplo da estrutura 5 em que Het representa um uracilo (h) e R₁ representa um grupo -(CH₂)₁₀-.

A. PREPARAÇÃO DE 11-DODECIN-1-OL (61).

Durante 140 minutos adicionou-se, gota a gota, 1-bromo-10-tetrahidropirani-oxi-decano (64,26 g; 0,200 mole,

4.

Lancaster, "97+%) a uma suspensão previamente arrefecida de complexo de acetileto de lítio e complexo de etilenodiamina (23,94 g; 0,260 mol; 1,3 eq., Aldrich, 90%) em dimetilsulfóxido seco (100 ml) de modo a que a temperatura interna permanecesse entre 5-10°C. Depois de se ter completado a adição removeu-se o banho de arrefecimento e agitou-se a mistura reaccional durante 4,5 horas. Adicionou-se água gota a gota (20 ml) à mistura reaccional. Depois de se agitar durante 10 minutos verteu-se a mistura reaccional em água (300 ml). Extraíu-se esta solução sequencialmente com penteno (2 X 300 ml) e com éter (2 X 300 ml). Lavou-se cada camada orgânica individualmente com água (cerca de 20 ml) e os produtos aquosos da lavagem combinaram-se com a camada aquosa principal para nova extracção. Secaram-se as camadas orgânicas combinadas sobre sulfato de magnésio e evaporou-se até à secagem para se obter 51,38 g (96%) de 12-(tetrahidropiraniloxi)-1-dodecina sob a forma de um óleo.

Adicionou-se uma resina de permuta de iões fortemente ácida (AG-50W-X8, 50 g; 5,1 meq./g. Bio-Rad) a uma solução do produto bruto anterior (49,96 g) numa mistura de clorofórmio (260 ml) e metanol (260 ml). Aqueceu-se a suspensão ao refluxo durante 4,5 horas e depois arrefeceu-se. Filtrou-se a mistura reaccional e concentrou-se o filtrado. A cromatografia do resíduo em gel de sílica (500 g) com 10%, 20% e 30% de acetato de etilo em hexanos para se obter 31 g de um óleo de pureza superior a 95% para uma mancha observada por CCF com detecção pelo ácido fosfomolibdico. A destilação desse material através de uma coluna Vigreux de 20 cm, originou, após uma produção prévia de 0,78 g, 17,91 g de 11-dodecin-1-ol (61) sob

a forma de um óleo incolor espesso (p.e. 104⁰-108⁰C a 1,4 torr (1,4 X 101325/760 Newton m⁻²)) o qual solidificou em repouso para se obter um sólido branco. Este material era 98% puro para um pico por CG.

¹H-RMN (CDCl_3) de produto cromatografado antes da destilação: 3,64 (t, 2H, -CH₂OH), 3,37 e 3,33 (m, 1H, $\underline{\text{HCCCH}_2}$), e 1,2-1,6 (m, 17H, $(\text{CH}_2)_8$ e OH). IV (película fina ou fundido): 3392 (O-H), 3311, 2930 e 2854 (C-H), 2160 (acetileno), 1466, 1432, 1394, 1371, 1352, 1328, 1303, 1103 e 1001.

B. PREPARAÇÃO DE 12-IODO-1-DODECINA (62)

Adicionou-se iodo (43,16 g; 170 mmole; 2,0 eq.) a uma suspensão de álcool 61 destilado (15,50 g; 85 mmole), imidazol (17,36 g; 255 mmole; 3,0 eq.) e trifenilfosfina (66,90 g; 255 mmol; 3,0 eq.) em tolueno seco (425 ml, armazenado em peneiros moleculares). Aqueceu-se a mistura reaccional ao refluxo com agitação vigorosa durante 25 minutos, tendo-se gerado uma solução amarela com um precipitado negro oleoso. Depois de arrefecer até 25⁰C, adicionou-se bicarbonato de sódio aquoso saturado (200 ml) e iodo (23,73 g; 93,5 mmole; 1,1 eq.) e agitou-se a mistura reaccional vigorosamente durante 1 hora. Adicionou-se sulfito de sódio aquoso saturado (40 ml) para extinguir a cor púrpura. Deixou-se que a mistura reaccional se separasse em duas camadas e lavou-se a camada orgânica com uma solução salina. Secou-se a camada orgânica sobre sulfato de magnésio e concentrhou-se. Dissolveu-se o resíduo em diclorometano (50 ml) e adi-

cionou-se éter (200 ml). Depois de repousar durante 30 minutos, eliminou-se o precipitado resultante (óxido de trifenilfosfina) por filtração e lavou-se com éter (100 ml). Mantendo-se em repouso por mais tempo, originou-se, a partir do licor-mãe e do produto de lavagem com éter combinados, uma segunda colheita de cristais que se eliminaram tal como anteriormente. Concentraram-se os licores-mãe combinados e os produtos de lavagem com éter e dissolveu-se em tolueno quente (200 ml). Colocou-se esta solução numa coluna de gel de sílica (500 g) e eluiu-se com tolueno (3 litros), para se obter 13,55 g (55%) de iodeto 62 sob a forma de um líquido instável amarelo claro. Este material apresentou-se 96% puro num pico por CG.

¹H-RMN (CDCl_3): 3,20 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{I}$), 2,17 (td, 2H, HCCCH_2), 1,94 (t, 1H, HCCCH_2^-), 1,82, 1,51 e 1,20-1,42 (m, 16H, $(\text{CH}_2)_8$).

C. PREPARAÇÃO DE 12-TRIFLUOROACETAMIDO-1-DODECINA (63).

Libertou-se hidreto de sódio (dispersão a 60% em óleo, Alfa) do óleo lavando rápida e cuidadosamente com pentano e secando no vácuo. Adicionou-se cerca de 10 porções de trifluoroacetamida (22,61 g; 200 mmole; 5 eq.) durante 50 minutos, a uma suspensão de hidreto de sódio livre de óleo (3,84 g; 160 mmole; 4 eq.) em dimetilformamida seca (90 ml, Aldrich). Quando, ao fazer-se esta adição, se descobriu que a mistura reacional estava a ficar quente, adicionou-se um banho de gelo-água e efectuou-se o resto da adição a uma temperatura interna aproximada de 10°C. Removeu-se o banho de ge-

lo-água e agitou-se a mistura reaccional até que a libertação de hidrogénio cessou. Depois de se agitar durante mais de 15 minutos, adicionou-se gota a gota, à mistura reaccional, durante 10 minutos, uma solução de iodeto 63 (11,69 g; 40,0 mmole) em dimetilformamida seca (10 ml). Depois de se agitar durante 4 horas a 25⁰C verteu-se a mistura reaccional rapidamente numa mistura agitada de cloreto de amónia aquoso saturado (200 ml), água (200 ml) e pentano (200 ml). Lavou-se o recipiente de reacção com uma mistura de água (50 ml), cloreto de amónio aquoso saturado (50 ml) e com pentano (200 ml). Deixou-se que as soluções combinadas se separassem em duas camadas e extraíu-se a camada aquosa com pentano (2 X 200 ml). Secaram-se as camadas orgânicas combinadas sobre sulfato de magnésio e evaporou-se até à secagem para se obter 10,42 g (94%) de trifluoroacetamida 63 sob a forma de um óleo que solidificou em repouso originando um sólido ceroso. A recristalização deste material no seio de hexanos em ebullição (100 ml) com arrefecimento lento até menos 20⁰C, originou 8,145 g (73%) de trifluoroacetamida 63 sob a forma de agulhas amarelo cloro (p.f. 46⁰-47⁰C).

¹H-RMN (CDCl_3): 6,27 (s largo, 1H, NHTFA), 3,34 (q aparente, 2H, -CH₂NHTFA), 2,18 (td, 2H, HCCCH₂-), 1,94 (t, 1H, HCCCH₂-), 1,20-1,65 (m, 16H, (CH₂)₈). IV (película fina ou fundido): 3312, 3298, 2932 e 2857 (C-H e N-H), 2117 (acetileno), 1706 (C=O), 1675, 1563, 1460, 1448, 1208, 1182, 1166, 722 e 634.

D. PREPARAÇÃO DE 5-(12-TRIFLUOROACETAMIDO-1-DODECINIL)-2',3'-DIDESOXIURIDINA (60).

Durante 24 horas fez-se o acoplamento de alcinilamina 63 protegida com 5-iodo-2',3'-didesoxiuridina (47; 676,2 mg; 2,00 mmole, preparado conforme descrito no exemplo 2A) de acordo com o procedimento geral descrito no exemplo 1C. A cromatografia em gel de sílica (100 g) com eluição com um gradiente de 0-5% de metanol em diclorometano, originou uma espuma vermelho escuro. Eliminou-se a impureza vermelha por cromatografia numa coluna de fase inversa (100 g, octa-decil-silano em gel de sílica de 40 micra, Baker) com 40% de água em metanol. Combinaram-se as frações apropriadas, concentrhou-se, e fez-se a evaporação conjunta duas vezes com etanol absoluto para se obter 731 mg de nucleosido de alcinilamino 60 sob a forma de um óleo límpido. Este material apresentou-se homogéneo por CCF e por RMN, com exceção da presença de etanol residual (25% molar, rendimento corrigido de 73%).

¹H-RMN (DMSO-d₆): 11,49 (s largo, 1H, H3), 9,38 (t distorcido, 1H, NHTFA), 8,15 (s, 1H, H6), 5,90 (dd, 1H, H1'), 5,12 (t distorcido, 1H, 5' OH), 4,35 (t, 0,25H, CH₂CH₂OH), 4,03 (m, 1H, H4'), 3,72 e 3,52 (m, 2H, H5'), 3,43 (m, 0,5H, CH₃CH₂OH), 3,16 (quinteto, 2H, -CH₂NHTFA), 2,34 (t, 2H, propargílico H), 2,16, 2,01 e 1,86 (m, 4H, H2' e H3'), 1,65-1,15 (m, 16H, (CH₂)₈), e 1,06 (t, 0,75H, CH₃CH₂OH).

L.

EXEMPLO 12

PREPARAÇÃO DE 5-(5-AMINO-1-PENTINIL)-2',3'-DIDESOXIURIDINA (64).

O composto 64 é um exemplo de um nucleotido de alcinilamino (I) em que Het representa um uracilo (h), R₁ representa um grupo (CH₂)₃ e R₂, R₃, R₅, R₆, R₇ e R₈ representam átomos de hidrogénio).

A. PREPARAÇÃO DE 5-AMINO-1-PENTINA (65).

Distilou-se amónia (340 g; 20 mmole) para uma bomba que continha 5-cloropentina (20,51 g; 0,200 mole) e iodeto de sódio (7,49 g; 0,050 mole; 0,25 eq.). vedou-se a bomba e aqueceu-se numa autoclave a 100 °C durante 12 horas. Deixou-se a amónia evaporar e agitou-se o resíduo com uma mistura de duas fases constituída por hidróxido de sódio (40 g; 1,0 mole; 5 eq.), água (100 ml) e éter (100 ml). Filtrou-se a mistura resultante e deixou-se separar em duas camadas. Secou-se a camada orgânica sobre sulfato de magnésio e destilou-se através de uma coluna de Vigreux de 20 cm. descobiou-se por CG que quatro fracções (12,46 g, p.e. 95°-127°C, pressão atmosférica) continha quantidades significativas de produto. Combinaram-se estas fracções e destilou-se cuidadosamente através de uma coluna de banda em espiral para se obter 6,55 g (39%) de 5-amino-1-pentina (65) sob a forma de um líquido instável incolor (p.e. 125,5°-126°C). verificou-se que este material era de pureza superior a 99% para um pico por CG.

¹H-RMN (CDCl_3) : 2,81 (t, $J = 7,5$, 2H, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2,27 (td, $J = 7,5$ e $2,5$, 2H, HCCCH_2-), 1,96 (t, $J = 2,5$, 1H, HCCCH_2-), 1,66 (quineto, $J = 7,5$, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), e 1,07 (s largo, 2H, NH_2).

B. PROCEDIMENTO GERAL PARA ACOPLAR ALCINILAMINAS DESPROTEGIDAS A IODONUCLEÓSIDOS. PREPARAÇÃO DE 5-(5-AMINO-1-PENTINO)-2',3'-DIDESOXIURIDINA (64).

Carregou-se um balão seco de fundo redondo de 35 ml, com 5-iodo-2',3'-didesoxiuridina (47 ; 676, 2 mg; 2,00 mmole, preparada conforme descrito no exemplo 2A) e depois limpou-se com árgon. Adicionou-se dimetilformamida seca (10 ml, Aldrich), trietilamina seca (0,56 ml; 4,0 mmole; 2,0 eq., armazenada em peneiros moleculares), 5-amino-1-pentino (0,59 ml; 6,03 mmole; 3,0 eq.) e tetraquis-(trifenilfosfina)-paládio (0) (231 mg; 0,200 mmole; 0,1 eq., pesada para dentro de um frasco numa caixa seca). Agitou-se a suspensão resultante durante 45 minutos mas o catalisador de paládio permaneceu parcialmente insolúvel. Adicionou-se iodeto cuproso (190,4 mg; 1,00 mmole; 0,5 eq., Aldrich Gold Label). Depois de se agitar durante 15 minutos, tinha-se formado uma solução azul homogénea e, decorridos cerca de 150 minutos, a solução tornou-se turva. Passados 200 minutos verificou-se por CCF que todo o iodeto 47 de partida tinha sido consumido. decorridas 4 horas, concentrou-se a mistura reacional num evaporador rotativo durante 10 minutos a 45°C e a 2 torr ($2 \times 101325/760 \text{ Newton} \text{ m}^{-2}$). O resíduo foi imediatamente absorvido numa coluna de gel de sílica (100 g) e eluiu-se com uma mistura de diclorometano, metanol e de hidróxido de amónia concentrado (400 ml

de cada uma das porções 90:9:1, 85:13:2, 75:20:5, 65:30:5 e 50:45:5). Combinaram-se as fracções que de acordo com a CCF continham o produto polar principal. Evaporou-se duas vezes, em conjunto com etanol e secou-se no vácuo durante a noite para se obter 395,9 g (67%) de nucleóside de alcinilamino 64 sob a forma de um sólido amarelo. Este material apresentou-se homogéneo por CCF e por RMN, com a exceção da presença de etanol (33 % molar) que não foi eliminado por secagem no vácuo. O rendimento de 64, corrigido para a presença de etanol, foi de 64%.

^1H -RMN (DMSO-d₆): 8,33 (s, 1H, H6), 5,90 (dd, J = 6,6 e 3,0, 1H, H1'), 4,05 (m, 1H, H4'), 3,73 (dd, J = 12,1 e 2,8, 1H, H5'a), 3,53 (dd, J = 12,1 e 3,1, 1H, H5'b), 2,80 (s largo, 2H, -CH₂H₂), 2,45 (t, J = 7,0, 2H, propargílico H), 2,28, 2,02 e 1,86 (m, 4H, H2' e H3'), e 1,70 (quinteto, J = 7,0 Hz, 2H, -CH₂CH₂CH₂-)

Estes dados do espectro RMN obtiveram-se a partir de uma porção diferente de 64 preparado de modo semelhante ao anteriormente descrito. Os sinais para os átomos de hidrogénio permutáveis (H3, 5'OH, e -NH₂) nas amostras de RMN de ambos os materiais, combinaram-se num único sinal largo (largura > 2 ppm) que se resolveu abertamente a partir da linha que serve de base.

EXEMPLO 13

PREPARAÇÃO DE 5-(3-AMINO-1-PROPINIL)-2',3'-DIDESOXIURIDINA (66).

O composto 66 é um exemplo de um nucleótido de alcinilamino

L.

(I) em que Het representa um uracilo (h), R₁ representa um grupo CH₂, e R₂, R₃, R₅, R₆, R₇ e R₈ representam átomos de hidrogénio).

Durante 3 horas fez-se o acoplamento de 5-iodo-2',3'-didesoxiuridina (47, 2,00 mmole) com propargilamina (6,00 mmole, Aldrich), de acordo com o procedimento descrito no exemplo 12 B, com a excepção de se utilizar propargilamina em vez de 5-amino-1-pentino. A cromatografia, conforme anteriormente descrito, originou 794,5 mg de nucleóside de alcinilamino 66 impuro sob a forma de um só lido amarelo o qual originou uma mancha única quando analisado por CCF. O espectro RMN e o equilíbrio de massa da reacção indicaram que este material estava contaminado por etanol e possivelmente por impurezas inorgânicas.

D ¹H-RMN (DMSO-d₆): 11,70 (s largo, 1H, H3), 8,40 (s, 1H, H6), 8,25 (s largo, 2H, NH₂), 5,89 (dd, J = 6,6 e 3,0, 1H, H1'), 5,13 (t, J = 5,0, 1H, 5'OH), 4,07 (m, 1H, H4'), 3,96 (s, 2H, -CH₂NH₂), 3,71 e 3,56 (m, 2H, H5'), 2,30, 2,04 e 1,85 (m, 4H, H2' e H3') e sinais para o etanol e para uma impureza desconhecida.

Os dados do espectro RMN anterior obtiveram-se a partir de uma preparação diferente de 66, de modo idêntico ao anterior, com a excepção de se terem utilizado 0,2 eq. de iodeto cuproso e de a reacção não se ter completado.

4.

EXEMPLO 14

PREPARAÇÃO DE TRIFOSFATO DE 1-(2-HIDROXIETOXIMETIL)-5-(3-AMINO-1-PROPINIL)-CITOSINA (67).

(O composto 67 é um exemplo de um nucleotido de alcinilamino (I) em que R_1 representa um grupo $-\text{CH}_2-$, R_2 e R_3 representam átomos de hidrogénio, Het representa citosina (i) R_4 , representa (g), e R_5 representa o grupo $\text{P}_3\text{O}_9\text{H}^{3-}$).

A. PREPARAÇÃO DE 1-(2-HIDROXIETOXIMETIL)-5-IODOCITOSINA (68).

Fez-se o refluxo de uma mistura de 1-(2-hidroxietoximetil)-citosina (1,85 g; 10,0 mmole) e acetato mercúrico (3,35 g; 10,5 mmole) em metanol (50 ml) e diclorometano (100 ml). Adicionou-se iodo (3,05 g; 12,0 mmole) e agitou-se a mistura reaccional durante 1 hora. Adicionou-se a forma de base livre da resina AG3-X4 (38 meq.) e fez-se borbulhar ácido sulfídrico na solução durante 15 minutos. Eliminaram-se os sólidos por filtração e verteu-se o filtrado sobre gel de sílica (10 g). Com esta sílica carregou-se uma coluna de gel sílica (4 X 25 cm) e eluiu-se com 5%, 10% e 20% de metanol em diclorometano. A evaporação seguida de secagem no vácuo originaram um sólido incolor (1,73 g; 56%).

A recristalização no seio de etanol a 95% originou material analiticamente puro (p.f. 172°C). Calculado para

C₇H₁₁N₂O₄I: C 27,03%, H 3,24%, N 13,51%. Encontrado C 27,08%, H 3,41% N 13,51%. UV (metanol): máximo a 292,5 (5,300). ¹H-RMN (DMSO-d₆): 3,481 (m, 4H), 4,659, (t, J = 5,1H), 5,070 (s, 2H), 6,665 (s largo, 1H), 7,869 (s largo, 1H), e 8,107 (s, 1H).

B. PREPARAÇÃO DE 1-(2-HIDROXIETOXIMETIL)-5-(3-TRIFLUOROACETAMIDO-1-PROPINIL)-CITOSINA (69).

Fez-se o acoplamento do iodeto 68 (311 mg; 1,00 mmole) a N-propargiltrifluoroacetamida (43), de acordo com o procedimento geral descrito no exemplo 1C. A cromatografia intermitente em gel de sílica (3 X 20 cm) com 5%, 10% e 20% de metanol em diclorometano originou o nucleótido de alcinilamino 69 sob a forma de uma espuma amarelo claro (77,4; 23%).

¹H-RMN(DMSO-d₆): 3,472 (s largo), 4,276 (d, J = 5,0, 2H), 4,653 (t largo, J = 4,5, 1H), 5,091 (s, 2H), 6,925 (s largo, 1H), 8,037 (s, 1H) e 9,964 (s largo, 1H).

C. PREPARAÇÃO DE 1-(2-HIDROXIETOXIMETIL)-5-(3-AMINO-1-PROPINIL)-CITOSINA (67).

Converteu-se o grupo hidroxilo da parte açúcar do nucleósido de alcinilamino 69 (0,167 mmole) num trifosfato e eliminou-se o grupo trifluoroacetilo seguindo o procedimento geral apresentado no exemplo 1E. Após a adição da segunda aliquota de oxi-cloreto de fósforo, permitiu-se que a fosforilação prosseguisse du-

rante 75 minutos. Admitindo para o produto um coeficiente de absorção igual ao do material de partida (7 790), o rendimento de trifosfato 67, baseado na sua absorção de UV a 291 nm, foi de 21%.

EXEMPLO 15

Preparação de éster de N-hidroxisuccinimida 2a

(Um reagente preferencial para ligar um corante fluorescente a 505 nm a um nucleotido de alcinilamino em R_9 e R_{10} representam átomos de hidrogénio)

A. Preparação de 9-(carboxietilideno)-3,6-di-hidroxi-9H-xantenó (SF-505).

Colocou-se resorcinol (33,0 g; 0,300 mole) e anidrido succínico (30,0 g; 0,300 mole) num balão de fundo redondo e purificou-se com azoto. Adicionou-se ácido metanossulfónico (150 ml) e agitou-se a solução a 65°C durante 2 horas numa atmosfera de azoto. Adicionou-se a mistura reaccional, gota a gota a água gelada (1 litro) vigorosamente agitada com adição simultânea de hidróxido de sódio para manter o pH num valor de $2,5 \pm 0,5$. O produto que surgiu como precipitado granular recolheu-se por filtração e lavou-se com água (3×100 ml) e depois com acetona (3×100 ml). Secou-se o produto ao ar e depois secou-se no vácuo (em estufa de vácuo) a 110°C durante 18 horas para proporcionar um pó vermelho escuro (37,7 g; 88%).

4.

Preparaou-se uma mostra analítica dissolvendo 1,0 g de produto em 25 ml de HCl 0,3 N quente. O precipitado que se formou ao arrefecer eliminou-se por filtração. Adicionou-se hidróxido de sódio aquoso diluído para aumentar o pH para 1,25. recolheu-se o precipitado resultante por filtração, lavou-se com água, secou-se ao ar e depois secou-se no vácuo sobre P₂O₅ a 140°C durante 36 horas.

Anal: Cal. C(16)H(12)O(5) C 67,60, H 4,26.

Encontrado: C 67,37, H 4,34, 0,52% de água (K.F.). RMN

(DMSO-d₆): (principalmente na forma de espirolactona) δ 2,690 (t, J = 8,6 Hz, 2H) ; 3,070 (t, J = 8,6 Hz, 2H), 6,530 (d, J = 1,8 hz, 2H): 6,676 (dd, 8,7, 1,8 Hz, 2H), 7,432 (d, J = 8,7, 1,8 Hz, 2H), 7,432 (d, J = 8,7 Hz, 2H), e 9,964 (s, 2H). Vis. abs. (pH 8,2 : 50 mM aq

Tris/HCl): max 486 nm (72 600).

B. Preparação de 9-(2-carboxietil)-3,6-diacetoxi-9-etoxi-9H-xanteno (Ac₂EtSF-505).

Adicionou-se SF-505 (29,3 g; 103 mmole) a anidrido acético arrefecido com gelo (500 ml) seguindo-se a adição de piridina (100 ml). Agitou-se a mistura em gelo durante 20 minutos e depois adicionou-se a água arrefecida com gelo (7 litros), agitada rapidamente durante 20 minutos. Depois de se agitar durante mais 30 minutos filtrou-se o produto intermediário e fez-se nova suspensão em água(4 litros) e agitou-se durante mais 30 minutos. Recolheu-se

o sólido por filtração, dissolveu-se em etanol absoluto (1 litro) e fez-se o refluxo durante 45 minutos. Concentrou-se a solução num evaprador rotativo para proporcionar 200 ml tendo-se observado a cristalização. Recolheu-se o produto por filtração, secou-se ao ar e depois secou-se no vácuo para se obter micro-cristais cor de laranja claros (21,9 g ; 51%).

A recristalização no seio de cloreto de metileno/ciclo-hexano proporcionou micro-cristais incolores. p.f. 142⁰-143⁰C. Anal: Cal. [C(22)H(22)O(8)] C 63,76, H 5,35. Encontrado: C 63,58, H 5,39. RMN (DMSO-d₆): δ 1,035 (t, J = 6,9 Hz, 3H), 1,667 (m, 2H), 2,232 (m, 2H), 2,294 (s, 6H), 2,888 (q, J = 6,9 Hz, 2H), 7,0-7,1 (m, 4H), e 7,575 (d, J=9,1 Hz, 2H).

C. Preparação de 9-[2-(N-succinimidilóxicarbonil)]-etil)-3,6-diacetoxi-9-etoxi-9H-xanteno
(Ac₂EtSF-505-NHS)

Misturou-se Ac₂EtSF-505 (10,4 g; 25,1 mmole) com cloreto de metileno (300 ml) e adicionou-se cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbo-di-imida (9,70 g; 50,6 mmole) e N-hidroxisuccinimida (4,32 g; 37,5 mmole). Agitou-se a mistura durante 1 hora e depois lavou-se com água (5 X 50ml). As camadas aquosas combinadas extraíram-se com cloreto de metileno (50 ml), secaram-se sobre sulfato de sódio e eliminaram-se. A trituração no seio de etanol (75 ml) seguida de filtração e secagem ao ar originou o produto bruto sob a forma de um sólido amarelo claro (cerca de 10 g). Dissol-

veu-se este material em cloreto de metileno (50 ml) e adicionou-se ciclo-hexano (50 ml). Adicionou-se uma colher de chá de carvão vegetal, filtrou-se a mistura e adicionou-se ao produto mais uma porção de ciclo-hexano (100 ml). Recolheu-se por filtração, secou-se ao ar e depois no vácuo originando cristais incolores (6,94 g; 54%).

Uma segunda cristalização no seio de etanol originou uma atmosfera analítica. p.f. 162⁰-163⁰C. Anal: [Calc. C(26)H(25)N(1)O(10)] C 61,05, H. 4,93, N 2,74. Encontrado: C 60,78, H 5,01, N 2,65. RMN (DMSO-d₆): δ 1,056 (t, J = 7,0 Hz, 3H), 2,4-2,1 (m, 4H), 2,293 (s, 6H), 2,757 (s, 4H), 2,922 (q, J=7,0 Hz, 2H), 7,069 (m, 4H), e 7,617 (p d, J=9,1 Hz, 2H).

D. Preparação de 9-[2-(N-metil-N-(benziloxicarbonilmethyl)carboxamido)etil]-3,6-diacetoxi-9H-xanteno (Ac₂EtSF-505-Sar-OBn).

A uma solução de éster*benzílico de sarco-sina (1,13 g; 6,31 mmole) em cloreto de metileno (50 ml) adicionou-se Ac₂EtSF-505-NHS (2,58 g; 5,05 mmole) e uma solução de bicarbonato de sódio aquoso a 5% (30 ml). Agitou-se rapidamente a mistura de duas fases, durante 20 horas. Separaram-se as camadas e lavou-se a camada orgânica com 3 X 15 ml de água, secou-se sobre sulfato de sódio e concentrou-se até 25 ml. Diluiu-se a solução para 150 ml com ciclo-hexano, tratou-se com carvão vegetal e reduziu-se para 75 ml numa corrente de azoto resultando a precipitação do produto. Decantou-se a parte sobrenadante e fez-se a evaporação do resíduo em conjunto com cloreto de metileno, para se obter uma espuma incolor (1,70 g; 58%).

A secagem intensa no vácuo proporcionou uma amostra analítica. Anal: Calc. [C(32)H(33)N(1)O(9)] C 66,77, H 5,78, N 2,43. Encontrado: C 66,66, H 5,89 N 2,25. RMN (DMSO-d₆): (Exibe uma mistura 5:2 de rotameros de ligação amida) S (principal e secundário) 1,040 e 1,018 (t, J=6,7 Hz, 3H), 1,789 e 1,670 (m, 2H), 2,211 (m, 2H), 2,290 e 2,276 (s, 6H), 2,713 e 2,695 (s, 3H), 2,893 (q, J=6,7 Hz, 2H), 3,963 (s, 2H), 5,075 e 5,039 (s, 2H), 7,044 (m, 4H), 7,324 (m, 5H). e 7,573 e 7,516 (p.d. J=9,2 Hz, 2H).

*O sal p-tosilato do éster benzílico de sarcosina (Adams Chemical Co.) foi extraído com cloreto de metíleno e lavou-se repetidamente com bicarbonato de sódio aquoso a 5%, depois lavou-se com água, secou-se sobre sulfato de sódio e eliminou-se.

E. Preparação de 9-[2-(N-metil-N-(N'-succinimidiloxicarbonilmetyl)carboxamido)etil]-3,6-diacetoxi-9H-xanteno (Ac₂EtSF-505-sar-NHS, Estrutura 2a).

A uma solução de Ac₂EtSF-505-Sar-OBn (1,55 g; 2,69 mmole) em etanol absoluto (60 ml) adicionou-se paládio em carvão a 10% (0,15 g). Agitou-se a mistura numa atmosfera pressurizada de hidrogénio durante 30 minutos. Eliminou-se o catalisador por filtração e eliminou-se o etanol para se obter um resíduo xaroposo.

Dissolveu-se o resíduo em cloreto de metíleno (85 ml) e adicionou-se N-hidroxisuccinimida (0,495 g; 4,300 mmole)

le) e cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbo-di-imida (1,12 g; 5,84 mmole) (4 X 25 ml). Concentrou-se a solução até 25 ml, diluiu-se para 175 ml com ciclo-hexano, tratou-se com carvão vegetal e reduziu-se o volume para 75 ml sob uma corrente de azoto. Recolheu-se o produto sólido por filtração, secou-se ao ar no vácuo para se obter um pó incolor (0,97 g; 62%).

A evaporação conjunta com cloreto de metíleno seguida por secagem intensa no vácuo a 40°C eliminou os vestígios de ciclo-hexano e originou uma amostra analítica de um sólido amorfo. Anal: Calc. [C(29)H(30)N(2)O(11)] C 59,79, H 5,19, N 4,81. Encontrado: C 59,37, H 4,62, N 4,62, 0,93% de água (K-F).RMN (DMSO-d₆): (Exibe uma mistura 4:1 de rotomeros de ligação amida) δ (principal e secundário) 1,034 (t, J=6,9 Hz, 3H), 1,827 e 1,935 (m, 2H), 2,223 (m, 2H), 2,289 (s, 6H), 2,758 (s, 4H), 2,779 e 2,824 (s, 3H), 2,888 (q, J=6,8 Hz, 2H), 4,333 e 4,473 (s, 2H), 7,043 (m, 4H) e 7,587 (por d, J=9,1 Hz, 2H).

EXEMPLO 16

Preparação de éster de N-hidroxisuccinimida 2b

(Um reagente preferencial para ligar um corante fluorescente a 512 nm a um nucleótido de alcinilamino em que R₉ representa H e R₁₀ representa CH₃).

A. Preparação de 4-metilresorcinol

Dissolveu-se 2,4-di-hidroxibenzaldeido (33,97 g; 0,246 mole) (recristalizado no seio de tolueno) em 2-propanol (3 litros) de pureza espectroscópica num balão de fundo redondo adaptado com uma entrada de gás e com uma saída de bolhas de gás. Adicionou-se paládio em carvão a 10% (1,35 g) seguindo-se a adição de ácido fosfórico (3ml) e tratou-se a mistura com azoto. Alterou-se o fluxo de azoto para um fluxo de hidrogénio e agitou-se a mistura rapidamente arrefecendo-a com gelo. Decorridas 3 horas tinha cessado completamente a libertação de hidrogénio e eliminou-se o catalisador por filtração. Eliminou-se o filtrado até se obterem 200 ml e adicionaram-se 200 ml de acetato de etilo. Lavou-se a solução com 4 X 200 ml de água e os extractos de água combinados extraíram-se com acetato de etilo. Estes extractos orgânicos lavaram-se com água e as camadas orgânicas combinadas secaram-se sobre sulfato de sódio e recolheram-se para se obter o produto sob a forma de um sólido cristalino incolor (29,95 g ; 98%). P.f. 106⁰C (na literatura 106⁰-107⁰C [J. C. Bell. W. Bridge, e A. Robertson. J.Chem. Soc., p.1542-45 (1937)]. RMN (DMSO-d_6): δ 1,961 (s,Me), 6,076 (dd, H-6, J[5,6] = 8 Hz, J[2,6] = 2 Hz), 6,231 (d,H-2), 6,760 (d, H-5) 8,867 (s,OH), e 9,008 (s,OH).

B. Preparação de 9-carboxietilidenô -3,6-di-hidroxi-2,7-di-metil-9H-xanteno (SF-512).

Colocou-se 4-metilresorcinol (25,8 g; 0,208 mole) e anidrido succínico (20,8 g, 0,208 mole) num balão de fundo

redondo e purificou-se o balão com azoto. Adicionou-se ácido metanosulfónico (150 ml) e aqueceu-se a solução numa atmosfera de azoto a 65°C durante 2 horas. Verteu-se a solução gota a gota em 1 litro de uma mistura de gelo/água fria agitada rapidamente, com a adição simultânea de hidróxido de sódio aquoso a 50% para manter o pH no valor de 2,25 ± 0,25. recolheu-se o produto por centrifugação e lavou-se com água (3X) e com acetona (2X). Secou-se o sólido ao ar e depois no vácuo a 110°C, para se obter um pó côr de tijolo (24,1 g; 74%).

A purificação efectuou-se permitindo que o acetato de etilo fluisse lentamente para o interior de uma solução do produto em dimetilssulfóxido. Recolheu-se o precipitado por filtração, secou-se ao ar e depois secou-se no vácuo. RMN (DMSO-d₆):(Apresenta uma forma delta puro em conjunto com uma mole de água e uma mole de dimetilssulfóxido). δ 2,124 (s, 6H), 3,421 (d, J=7,2 Hz, 2H). 5,769 (t, J=7,2 Hz, 1H); 6,512 (s, 1H), 6,573 (s, 1H); 7,295 (s, 2H). 9,681 (s, 1H), 9,825 (s, 1H), e 12,346 (s largo 1H). Vis. abs (pH 8,2 Tris aq): max 493,5 nm.

C. Preparação de 9-carboxietil-3,6-diacetoxi-2,7-dimetil-9-etoxy-9H-xanteno (Ac₂EtSF-512).

Adicionou-se uma amostra de SF-512 (20,0 g 64,0 mmole) a anidrido acético (350 ml) seguindo-se a adição de piridina (80 ml). Agitou-se durante 1 hora e depois filtrou-se para eliminar os vestígios do corante que não reagiu. verteu-se o filtrado em 3,5 litros de água agitada rapidamente. Recolheu-se o intermediário

sólido por filtração, fez-se nova suspensão em 2 litros de água fria, agitou-se durante 15 minutos e depois recolheu-se e secou-se ao ar para se obter o intermediário de espirolactona (20,8 g). Dissolveu-se este produto em etanol absoluto (600 ml) e fez-se o refluxo durante 45 minutos. tratou-se a solução com carvão e concentrou-se até 300 ml. Recolheu-se o produto por filtração, lavou-se com etanol frio (2X50 ml), secou-se ao ar e depois secou-se no vácuo para se obter micro-cristais incolores (14,9 g; 53%). P.f. 143⁰C. Anal:Calc. [C(24)H(26)O(8)] C 65,15, H 5,92. Encontrado: C 65,31, H 5,97. RMN (DMSO-d₆): δ 1,027 (t, J=6,9 Hz, 3H), 1,628 (m, 2H), 2,136 (s, 6H). 2,207 (m, 2H), 2,303 (s, 6H), 2,884 (q, J=6,9 Hz, 2H), 6,939 (s, 2H). e 7,417 (s, 2H).

D. Preparação de 9-[2-(N-succinimidiloxicarbonil)-etil]-3,6-diacetoxi-2,7-dimetil-9-etoxy-9H-xanteno (Ac2EtSF-512-NHS)

A uma solução de Ac2EtSF-512 (9,42 g; 21,3 mmole) em cloreto de metíleno (175 ml) adicionou-se N-hidroximida (3,62 g; 31,5 mmole) seguido da adição imediata de cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodi-imida (8,05 g; 42,0 mmole). Agitou-se a solução à temperatura ambiente durante 2 horas, Lavou-se a mistura com água (4 X 100 ml) e fez-se a extração dos produtos da lavagem com cloreto de metíleno (2 X 50 ml). As camadas orgânicas combinadas secaram-se sobre sulfato de sódio e concentrou-se para se obter um óleo. Adicionou-se etanol absoluto e provocou-se a cristalização por nucleação. Recolheu-se o produto por

filtração, secou-se ao ar e depois secou-se np vácuo para se obter micro-cristais de cor laranja claro (9,80 g; 85%).

Preparou-se uma amostra analítica dissolvendo 1 g em cloreto de metileno (10 ml) e adicionando ciclo-hexano (40 ml). O tratamento com carvão vegetal seguido de arrefecimento e cristalização provocada por nucleação, originaram um sólido cristalino incolor. P.f. 159⁰C. Anal: Calc. [C(28)H(29)N(1)O(10)] C 62,33, H 5,42, N 2,60. Encontrado: C 62,06, H 5,71, N 2,39. RMN (DMSO-d₆): 1,053 (t, J=6,9 Hz, 3H), 2,149 (s, 6H), 2,304 (s, 1H), 2,1-2,4 (m, 4H), 2,747 (s, 4H), 2,920 (q, J=6,9 Hz, 2H), 6,975 (s, 2H), e 7,464 (s, 2H).

E. Preparação de 9-[2-(N-metil-N-(benziloxicarbonilmetil)-carboxamido)etil]-3,6-diacetoxi-2,7-dimetil-9-etoxi-9H-xanteno (Ac₂EtSF-512-Sar-OBn).

A uma solução de éster benzílico de sarcosina (0,72 g; 4,02 mmole) em cloreto de metileno (25 ml) adicionou-se Ac₂EtSF-512-NHS (1,73 g; 3,21 mmole) e uma solução de bicarbonato de sódio aquoso a 5% (20 ml). Agitou-se rapidamente a mistura de duas fases durante 20 horas. Separaram-se as camadas e lavou-se a camada orgânica com 3 X 15 ml de água, secou-se sobre sulfato de sódio e concentrou-se até 10 ml. Diluiu-se a solução para 60 ml com ciclo-hexano, tratou-se com carvão vegetal e reduziu-se para 25 ml sob uma corrente de azoto originando a precipitação do produto.

Decantou-se a parte sobrenadante e secou-se no vácuo o sólido incolor (1,44 g; 74%).

A recristalização no seio de cloreto de metileno/ciclo-hexano seguida do tratamento com carvão vegetal, originou uma amostra analítica. P.f.: 150°-152°C. Anal: Cal. [C(34)H(37)N(1)O(9)] C 67,65 H 6,18 N 2,32. Encontrado: C 67,42 H 6,08 N 2,33. RMN (DMSO-d₆): (Exibe uma mistura 5:2 de rotomeros de ligação amida) δ (principal e secundário) 1,049 e 1,008 (t, J=6,8 Hz, 3H), 1,747 e 1,66 (m, 2H), 2,144 e 2,115 (s, 6H), 2,18 (m, 2H), 2,314 e 2,303 (s, 6H), 2,694 (s, 3H), 2,907 e 2,884 (q, J=6,8 Hz, 2H), 3,961 (s, 2H), 5,075 e 5,016 (s, 2H), 6,960 e 6,917 (s, 2H), 7,430 e 7,396 (s, 2H), e 7,30 (m, 5H).

F. Preparação de 9-[2-(N-metil-N-(N'-succinimidiloxilcarbonilmetil)-carboxamido)-etil]-3,6-diacetoxi-9-etoxi-2,4,5,7-tetrametil-9H-xanteno.

(Ac₂EtSF-512-Sar-NHS, Estrutura 2b)

A uma suspensão de Ac₂EtSF-512-Sar-OBn (0,45 g; 0,745 mole) em etanol absoluto (20 ml), adicionou-se paládio em carvão a 10% (0,05 g). Agitou-se a mistura numa atmosfera pressurizada de hidrogénio durante 30 minutos. Eliminou-se o catalisador por filtração e eliminou-se o etanol para originar um resíduo xaroposo.

Dissolveu-se este resíduo em cloreto de metileno (25 ml) e adicionou-se N-hidroxissuccinimida (0,129 g; 1,12 mmole) e cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbo-di-imida (0,292 g; 1,52 mmole). Agitou-se esta mistura durante 30 minutos e depois lavou-se com água (3 X 15 ml). Secou-se a solução sobre sul-

fato de sódio, concentrou-se até 10 ml, diluiu-se até 40 ml com ciclo-hexano, tratou-se com carvão vegetal e reduziu-se o volume para 20 ml sob uma corrente de azoto. Decantou-se a parte sobrenadante e submeteu-se o resíduo a uma segunda precipitação no seio de cloreto de metileno, para se obter um pó incolor (0,27 g; 59%). Anal: Cal. [C (31)H(34)N(2)O(11)] C 60,98, H 5,61, N 4,59. Encontrado: C 60,28, H 5,71, N 4,40, 1,08% água (K-F). RMN (DMSO-d₆): (Exibe numa mistura 5:1 de rotameros próximo da ligação amida) δ (principal e secundário) 1,043 (t, J=7,0 Hz, 3H) 1,793 e 1,933 (m,2H), 2,145 e 2,133 (s, 6H), 2,198 (m,2H), 2,314 (s, 6H), 2,740 (s,4H), 2,778 e 2,821 (s, 3H), 2,900 (q, J=7,0 Hz, 2H), 4,334 e 4,469 (s, 2H), 6,960 e 6,925 (s, 2H0) e 7,441 (s,2H)

EXEMPLO 17

Preparação de éster de N-hidroxissuccinimida 2c

(Um reagente preferencial para ligar um corante fluorescente a 519 nm a um nucleótilo de alcinilamino em que R₉ representa um átomo de hidrogénio).

A. Preparação de 9-(2-carboxietilideno)-3,6-di-hidroxi-4,5-dimetil-9H-xanteno (SF-519).

Colocou-se 2 metilresorcinol (37,2 g; 0,300 mole) e anidrido succínico (30,0 g; 0,300 mole) num balão de fundo redondo e purificou-se com azoto. Adicionou-se ácido metanossulfónico (150 ml) e agitou-se a solução a 65⁰C durante 4 horas numa

atmosfera de azoto. Adicionou-se a mistura reaccional gota a gota, a uma mistura de gelo/água (1 litro) rapidamente agitada com adição simultânea de hidróxido de sódio aquoso a 50% para manter o pH no valor $6,0 \pm 0,5$. Recolheu-se por centrifugação o sólido finamente dividido e lavou-se com água (4×250 ml), fazendo de cada vez nova suspensão, centrifugação e eliminação da parte sobrenadante. Com o produto bruto fez-se uma suspensão em água (1 litro) e adicionou-se hidróxido de sódio aquoso a 50% suficiente para subir o pH para 10,2. Filtrou-se a solução a ajustou-se o pH do filtrado para 1,2 com HCl concentrado. Recolheu-se o produto por centrifugação e lavou-se com água (3×350 ml) e acetona (3×250 ml) conforme atrás descrito. Fez-se a destilação azeotrópica do sólido resultante com tolueno, recolheu-se por filtração, secou-se no vácuo a 110°C para se obter um pó côr de tijolo 5 (24,6 g; 53%). Anal: Calc. [C(18)H(16)O(5)] C 69,22 H, 5,16. Encontrado; C 68,95 H 5,30. 0,80% de água (K-F). RMN (DMSO-d₆) (principalmente na forma delta): δ 2,164 (s, 3H), 2,177 (s, 3H), 3,376 (d, J=7,1 Hz, 2H), 5,749 (t, J=7,2 Hz, 1H), 6,642 (d, J=8,8 Hz, 1H), 6,672 (d, J=8,8 Hz, 1H), 7,216 (d, J=8,5 Hz, 1H), 7,227 (d, J=8,5 Hz, 1H), 9,602 (s largo, 1H), e 9,758 (s largo, 1H). Vis. abs. (pH 8,2: 50 mM Tris aq/HCl) max 500 nm (69 800).

B. Preparação de 9-(2-carboxietil)-3,6-diacetoxi-4,5-dimeticil-9-etoxy-9H-xanteno (Ac₂EtsF-519)

Adicionou-se SF-519 (15,0 g; 48,0 mmole) a anidrido acético (250 ml) e pulverizou-se o sólido. (O tratamento

4.

por ultra-sons é útil para dispersar o SF-519 altamente insolúvel). Arrefeceu-se a suspensão com gelo, adicionou-se piridina (50 ml) e agitou-se a mistura durante 20 minutos. Filtrou-se a solução e, em corrente lenta mas estável, adicionou-se a uma mistura de gelo/água (4 litros) vigorosamente agitada. Depois de se agitar durante mais 20 minutos, filtrou-se o produto intermediário, fez-se nova suspensão em água (3 litros) e agitou-se durante mais 25 minutos. Recolheu-se o sólido por filtração e secou-se ao ar. O intermediário seco dissolveu-se em etanol absoluto (600 ml) e fez-se o refluxo durante 1 hora. Concentrou-se a solução num evaporador rotativo até 200 ml tendo resultado a cristalização. Recolheu-se o produto por filtração, secou-se ao ar e depois secou-se no vácuo para se obter micro-cristais incolores (12,13 g; 57%).

Preparou-se uma amostra analítica por precipitação no seio de uma solução de cloreto de metileno com ciclohexano. RMN (DMSO-d_6): δ 1,033 (t, $J=6,9$ hz, 3H), 1,674 (m, 2H), 2,189 (s, 6H), 2,19 (m, 2H), 2,348 (s, 6H), 2,878 (q, $J=6,9$ hz, 2H), 7,006 (d, $J=8,6$ hz, 2H), e 7,399 (d, $J=8,6$ hz, 2H).

C. Preparação de 9-[2-(N-succinimidiloxicarbonil)-etil]-3,6-diacetoxi-4,5-dimetil-9-etoxi-9H-xanteno (Ac₂EtSF-519-NHS)

Misturou-se Ac₂EtSF-519 (7,80 g; 17,6 mmole) com cloreto de metileno (175 ml) e adicionou-se N-hidroxissuccinimida (2,75 g; 23,9 mmole) e cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbo-di-imida (7,00 g; 36,5 mmole). Agitou-se a mistura durante

4.

te 90 minutos e depois lavou-se com água (5 X 100 ml). Fez-se a extracção das camadas aquosas combinadas com cloreto de metileno (2 X 50 ml) e secaram-se essas camadas orgânicas combinadas sobre sulfato de sódio e concentrhou-se. A trituração no seio de etanol (100 ml) seguida de filtração e secagem ao ar, originou o produto sob a forma de um sólido amarelo claro (7,45 g; 78%).

Duas recristalizações no seio de ciclo-hexano/cloreto de metileno, com tratamento com carvão vegetal originou uma amostra analítica. P.f. 164⁰-165⁰C . Anal Calc. [C(28)H(29)N(1)O(10)] C 62,33, H 5,42, N 2,60. Encontrado C 62,17, H 5,47, N 2,48. RMN (DMSO-d₆): δ 1,051 (t, J = 7,0 Hz, 3H), 2,4 - 2,1 (m,4H), 2,191 (s, 6H), 2,337 (s, 6H), 2,715 (s,4H), 2,912 (q, J=7,0 Hz,2H), 7,015 (d, J=8,6 Hz, 2H) e 7,429 (d, J=8,6,Hz,2H).

D. Preparação de 9-[2-(N-metil-N-(benziloxicarbonilmetyl)-carboxamido)-etil]-3,6-diacetoxi-4,5-dimetil-9-etoxi-9H-xanteno (Ac2EtSF-519-Sar-OBn).

A uma solução de éster benzílico de sarcosina (0,557 g; 3,11 mmole) em cloreto de metileno (19 ml) adicionou-se Ac2EtSF-519-NHS (1,30 g; 2,41 mmole) e uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 5% (15 ml). Agitou-se a mistura de duas fases rapidamente durante 18 horas. Separaram-se as camadas e lavou-se a camada orgânica com 3 X 10 ml de água, secou-se sobre sulfato de sódio e concentrhou-se até 10 ml. Diluiu-se a solução para 40 ml com ciclo-hexano, tratou-se com carvão vegetal e reduziu-se para 20 ml sob

uma corrente de azoto resultando a precipitação do produto sob a forma de um sólido viscoso. Decantou-se a parte sobrenadante e fez-se a evaporação conjunta do resíduo com cloreto de metileno, para se obter uma espuma incolor (0,97 g; 67%).

A secagem intensa no vácuo originou uma amostra analítica. Anal:Calc. [C(34)H(37)N(1)O(9)] C 67,65 H 6,18 N 2,32. Encontrado: C 67,43 H 6,37 N 2,32. RMN (DMSO-d₆) (Exibe uma mistura 5:2 de rotomeros de ligação amida): δ (principal e secundário) 1,044 e 1,020 (t, J=7,0 Hz, 3H), 1,824 e 1,714 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 2,195 e 2,169 (s, 6H), 2,346 e 2,337 (s, 6H), 2,720 e 2,691 (s, 3H), 2,889 (q, J=7,0 Hz, 2H), 3,959 e 3,988 (s, 2H), 5,073 e 5,048 (s, 2H), 7,000 e 6,954 (d, J=8,6 Hz, 2H) e 7,45-7,25 (m, 7H).

E. Preparação de 9-[2-(N-metil-N-(N'-succinimidiloxicarbonilmethyl)-carboxamido)-etil]-3,6-diacetoxi-4,5-dimetil-9-etoxy-9H-xanteno.

(Ac₂EtSF-519-sar-NHS, Estrutura 2c)

A uma solução de Ac₂EtSF-519-Sar-OBn (1,35 g; 2,24 mmole) em etanol absoluto (50 ml) adicionou-se paládio em carvão a 10% (0,13 g). Agitou-se a mistura numa atmosfera pressurizada de hidrogénio durante 20 minutos. Eliminou-se o catalisador por filtração e eliminou-se o etanol para se obter um resíduo xaroposo.

Dissolveu-se este resíduo em cloreto de metileno (50 ml) e adicionou-se N-hidroxissuccinimida (0,39 g; 3,39 mmole) e cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbo-di-imida (1,57 g; 8,19 mmole). Agitou-se a mistura durante 75 minutos e depois

lavou-se com água (4×15 ml). Secou-se a solução sobre sulfato de sódio, concentrou-se para 25 ml, diluiu-se para 125 ml com ciclo-hexano, tratou-se com carvão vegetal e reduziu-se em volume para 50 ml sob uma corrente de azoto. Decantou-se a parte sobrenadante e extraíu-se o óleo remanescente com cloreto de metileno (5ml) e adicionou-se gota a gota, a ciclo-hexano agitado rapidamente (75 ml), para se obter um pó incolor (0,587g; 43%).

Para proporcionar uma amostra analítica, extraíu-se uma porção do produto com cloreto de metileno, secou-se sobre peneiros moleculares, evaporou-se sob uma corrente de azoto e finalmente secou-se com uma pistola de secagem a 48°C sobre pentóxido de fosforo, durante 20 horas. Anal: Calc. / C(31)H(34)N(2)O(11) /; C 60,98, H 5,61, N 4,59. Encontrado: C 60,15, H 5,71, N 4,51, água (K-F) 1,51%. RMN (DMSO-d₆) (Exibe uma mistura 4:1 de retomeros de ligação amida): (principal e secundário) 1,039 (t, J=6,9 Hz, 3H) 1,841 e 1,945 (m, 2H), 2,19 (m, 2H), 2,194 (s, 6H), 2,345 (s, 6H), 2,767 e 2,744 (s, 4H), 2,778 e 2,825 (s, 3H), 2,888 (q, J=6,9 Hz 2H), 4,328 e 4,461 (s, 2H), 7,000 (d, J=8,6 Hz, 2H), e 7,410 (d, J=8,6 Hz, 2H).

EXEMPLO 18

Preparação de éster de N-hidroxissuccinimida 2d

(Um reagente preferencial para ligar um corante a 526 nm a um nucleótido de alcinilamino em que R₉ e R₁₀ representam grupos CH₃)

L.

A. Preparação de 2,4-di-hidroxi-3-metilbenzaldeido

Adicionou-se oxicloreto de fósforo (80 ml; 0,86 mole) a uma mistura agitada de N-metilformanilida (102 ml; 0,82 mole) em éter (250 ml). Agitou-se a mistura durante uma hora à temperatura ambiente e depois arrefeceu-se com gelo. Adicionou-se 2-metilresorcinol (Aldrich, 100 g; 0,81 mole) e deixou-se a mistura aquecer até à temperatura ambiente enquanto se agitava durante a noite. Recolheu-se o produto intermediário precipitado por filtração e lavou-se com éter (3X). Fez-se a hidrólise do produto intermediário dissolvendo-o numa mistura de acetona (250 ml) e de água (250 ml) e agitando durante 30 minutos. Adicionou-se água (2 litros), levou-se a mistura até ao ponto de ebulição e depois deixou-se arrefecer para se depositar um produto cristalino. Este produto recristalizou uma segunda vez no seio de água (4 litros), para se obter um produto puro (70 g; 57%). P.f. 150⁰C (na literatura 152⁰-153⁰C. W. Baker e outros "J. Chem. Soc.", (1949); p. 2834-5) RMN (DMSO-d₆): δ 1,973 (s, 3H), 6,551 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,428 (d, J=8,5 Hz, 1H), 9,703 (s, 1H), 10,745 (s, 1H), e 11,592 (s, 1H).

B. Preparação de 2,4-dimetilresorcinol

Arrefeceu-se com gelo uma solução de 2,4-di-hidroxi-3-metilbenzaldeido (30,0 g; 197 mmole) com isopropanol (3 litros), num balão de ensaio de 5 litros com três bocas adaptado, com um agitador magnético. Adicionou-se ácido fosfórico (4 ml) e pa-

ládio em carvão a 10% e aspergiu-se a solução com azoto e depois com hidrogénio. Quando se admitiu que a libertação de gás tinha cessado (cerca de 1,5 horas) aspergiu-se novamente a solução com azoto e depois filtrou-se através de Celite^R. Eliminou-se o dissolvente, extraíu-se o resíduo com acetato de etilo e lavou-se a solução resultante com água (4 X 100 ml). Fez-se nova extracção dos produtos da lavagem com acetato de etilo e secaram-se as camadas orgânicas combinadas sobre sulfato de sódio e concentrar-se. A sublimação (95°C; 0,05 torr ($0,05 \times 101325 / 760$ Newton m⁻²) originou um sólido incolor (19,6g; 72%). P.f. 107°-108°C (Na literatura 108°-109° [W. Baker e outros., "J. Chem. Soc." (1949) p. 2834-5]). RMN (DMSO-d₆): 1,969 (s, 3H). 2,037 (s, 3H), 6,220 (d, J=8,1 Hz, 1H), 6,637 (d, J=8,1 Hz, 1H). 7,929 (s, 1H), e 8,785 (s, 1H).

C. Preparação de 9-(2-carboxietilideno)-3,6-di-hidroxi-2,4,5,7-tetrametil-9H-xanteno (SF-526).

Colocou-se 2,4-dimetilresorcinol (28,4 g; 0,205 mole) e anidrido succínico (20,0 g; 0,200 mole) num balão de fundo redondo e purificou-se com azoto. Adicionou-se ácido metanossulfónico (231 ml) e agitou-se a solução a 70°C durante 20 horas numa atmosfera de azoto. Adicionou-se a mistura reacional gota a gota a uma mistura de hidróxido de sódio aquoso (95 g em 150 ml de água) e gelo (3 litros) rapidamente agitada. Adicionou-se uma quantidade suficiente de ácido metanossulfônico para ajustar o valor final do pH entre 4,7 e 1,5. Recolheu-se o sólido resultante por centrifugação e lavou-se fazendo-se nova suspensão, centrifugando e decantando a

partir de água (5 X 1,2 litros). recolheu-se a suspensão final por filtração, secou-se ao ar e depois secou-se em estufa a 110°C durante 6 horas para se obter um sólido cor de tijolo (30,6 g; 44%).

Uma segunda precipitação no seio de uma solução alcalina, seguida de centrifugação e lavagens com água, originou uma amostra analítica. Anal: Calc. [C(16)H(12)O(5)] C 70,57. H 5,92. Encontrado: C 70,39, H 6,00, 0,21% de água (K-F). RMN(DMSO-d₆) (principalmente na forma de espirolactona): δ 2,172 (s, 12H). 2,508 (m, 2H), 3,342 (m, 2H), e 7,604 (s, 2H). Vis. abs. (pH 8,2; Tris aq/HCl): 509 nm (71.300).

C. Preparação de 9-(2-carboxietil)-3,6-diacetoxi-9-etoxi-2,4,5,7-tetrametil-9H-xanteno
(Ac2EtSF-526)

Adicionou-se SF-526 (25,2 g; 74 mmole) a anidrido acético (450 ml) arrefecido com gelo, seguindo-se a adição de piridina (100 ml). Agitou-se a mistura com arrefecimento com gelo durante 150 minutos. Filtrou-se a mistura reaccional e depois adicionou-se, em corrente lenta e estável a uma mistura de gelo/ água fria (7 litros) rapidamente agitada. Depois de se agitar durante mais 30 minutos, filtrou-se o produto intermediário, lavou-se com água, fez-se nova suspensão em água (4 litros) e agitou-se durante mais 30 minutos. Recolheu-se o sólido por filtração e secou-se ao ar para se obter o produto intermediário de espirolactona (28,9 g). Dissolveu-se uma porção deste produto intermediário (18,6 g) em etanol abso-

luto (1 litro) e fez-se o refluxo durante 90 minutos. Concentrou-se a solução num evaporador rotativo até 300 ml o que originou a cristalização. Recolheu-se o produto por filtração, lavou-se com etanol, secou-se ao ar e depois secou-se no vácuo para se obter micro-cristais incolores (11,6 g, 52% baseados na quantidade de produto intermediário utilizado).

A recristalização no seio de cloreto de metileno/ciclo-hexano com tratamento com carvão vegetal originou micro-cristais incolores. P.f.: 154⁰-155⁰C. Duas evaporações no seio de cloreto de metileno eliminaram os traços de ciclo-hexano para análise. Anal: Calc. [C(20)H(20)O(5)] C 70,57, H 5,92. Encontrado: C 70,39, H 6,00, 0,21% de água (K-F). RMN (DMSO-d₆) (principalmente na forma de espirolactona): δ 2,172 (s, 12 H), 2,508 (m, 2H), 3,342 (m, 2H), e 7,604 (s, 2H). Vis. abs. (pH 8,2; Tris aq 50 mM HCl): 509 nm (71 300).

E. Preparação de 9-[2-(N-succinimidiloxicarbonil)-etil]-3,6-diacetoxi-9-etoxy-2,4,5,7-tetra-metil-9H-xanteno (Ac₂EtSF-526-NHS)

Misturou-se Ac₂EtSF-526 (4,70 g; 9,99 mmole) com cloreto de metileno (75 ml) e adicionou-se cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbo-di-imida (3,10 g; 16,2 mmole) e N-hidroxissuccinimida (1,50 g; 13,0 mmole). Agitou-se a mistura durante 90 minutos e depois lavou-se com água (4 X 50 ml). Fez-se nova extração das camadas aquosas combinadas com cloreto de metileno(50 ml) e secaram-se as camadas orgânicas combinadas sobre sulfato de

4.

sódio e concentrou-se. A trituração no seio de etanol (75 ml) seguida de filtração e secagem ao ar, originou o produto bruto sob a forma de um sólido amarelo claro (cerca de 4,7 g). Dissolveu-se este material em cloreto de metileno (50 ml) e adicionou-se ciclo-hexano (50 ml). Adicionou-se uma colher de chá de carvão vegetal, filtrou-se a mistura e tratou-se o produto com uma porção adicional de ciclo-hexano (25 ml). A recolha por filtração, secagem ao ar e secagem no vácuo originaram cristais incolores (3,14 g; 55%).

Uma segunda precipitação no seio de cloreto de metileno com ciclo-hexano originou uma amostra analítica. Anal: Calc. [C(30)H(33)N(1)O(10)] : C 63,48, H 5,86 N 2,47. Encontrado: C 63,08, H 6,00, N 2,37. RMN (DMSO-d₆): δ 1,058 (t, J=6,9 Hz, 3H), 2,136 (s, 6H), 2,155 (s, 6H), 2,228 (m, 4H), 2,371 (s, 6H), 2,748 (s, 4H). 2,918 (q, J=6,9 Hz, 2H), e 7,300 (s, 2H).

F. Preparação de 9-[2-(N-metil-N-(benziloxicarbonilmetil)-carboxamido)-etil]-3,6-diacetoxi-9H-xanteno (Ac₂EtSF-505-Sar-OBn)

A uma solução de éster benzílico de sarco-sina (0,72 g; 4,02 mmole) em cloreto de metileno (40 ml adicionou-se Ac₂EtSF-526-NHS (1,82 g; 3,21 mmole) e também uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 5% (30 ml). Agitou-se rapidamente a mistura de duas fases durante 20 horas. Separaram-se as camadas e lavou-se a camada orgânica com 4 X 15 ml de água, secou-se sobre sulfato de sódio e concentrou-se até 15 ml. Diluiu-se a solução até 100 ml com ciclo-he-

xano, tratou-se com carvão vegetal e reduziu-se para 50 ml sob uma corrente de azoto originando a precipitação do produto. A filtração seguida da secagem ao ar originou um sólido incolor (0,86 g; 47%).

A evaporação conjunta com cloreto de metileno seguida de secagem intensa no vácuo originou uma amostra analítica. Anal: Calc. para $[C(36)H(41)N(1)O(9)]$ C 68,45, H 6,54, N 2,22. Encontrado: C 68,29, H 6,70, N 2,07. RMN (DMSO-d₆) (Exibe uma mistura 5:2 de rotomeros da ligação amida): δ (principal e secundário) 1,049 e 1,027 (t, J=6,8 Hz, 3H), 1,783 e 1,700 (m, 2H), 2,129 e 2,099 (s, 6H), 2,159 e 2,129 (s, 6H), 2,14 (m, 2H), 2,379 e 2,371 (s, 6H), 2,699 e 2,690 (s, 3H), 2,873 (q, J=6,8 Hz, 2H), 3,958 e 3,976 (s, 2H), 5,075 e 5,019 (s, 2H), 7,266 e 7,233 (s, 2H), e 7,25-7,40 (m, 5H).

G. Preparação de 9-(2-(N-metil-N-(N'-succinimidiloxicarbonilmethyl)-carboxamido)-etil)-3,6-diacetoxi-9-etoxi-2,4,5,7-tetrametil-9H-xanteno (Ac₂EtSF-526-Sar-NHS, Estrutura 2d)

A uma solução de Ac₂EtSF-526-Sar-OBn (0,96 g; 1,52 mmole) em etanol absoluto (40 ml) adicionou-se paládio em carvão a 10% (0,10 g). Agitou-se a mistura sob uma atmosfera pressurizada de hidrogénio durante 30 minutos. Eliminou-se o catalisador por filtração e eliminou-se o etanol para se obter um resíduo xaroposo. Dissolveu-se o resíduo em cloreto de metileno (40 ml) e adicionou-se N-hidroxissuccimida (0,26 g; 2,26 mmole) e cloridrato de 1—3-dimetilaminopropil---3-etylcarbo-di-imida (0,59 g; 3,08 mmole). Agitou-se a mistura durante 30 minutos e depois lavou-se com água (4 X 15 ml). Secou-se a solução sobre sulfato de sódio, concentrou-se até 15 ml, diluiu-se para

100 ml com ciclo-hexano, tratou-se com carvão vegetal e reduziu-se em volume para 50 ml sob uma corrente de azoto. Recolheu-se o produto por filtração, secou-se ao ar e secou-se no vácuo para se obter micro-cristais incolores (0,573 g; 59%).

A evaporação conjunta com cloreto de metilenos seguida de secagem intensa no vácuo a 40°C eliminou os traços de ciclo-hexano e originou uma amostra analítica de um sólido amorfos. RMN (DMSO-d₆): δ 1,043 (t, J=6,7 Hz, 3H), 1,82 (m, 2H), 2,130 (s, 6H), 2,157 (s, 6H), 2,15 (m, 2H), 2,378 (s, 6H), 2,748 (s, 4H), 2,778 (s, 3H), 2,891 (q, J=6,7 Hz, 2H), 4,327 (s, 2H), e 7,275 (s, 2H).

EXEMPLO 19

MÉTODO GERAL PARA ACOPLAR NUCLEÓTIDOS DE ALCINILAMINO COM ESTERES DE N-HIDROXISSLUCCINIMIDA 2

PREPARAÇÃO DE NUCLEÓTIDOS DE ALCINILAMINO COM TERMINAÇÃO DE CADEIA MARCADA POR FLUO- RESCÊNCIA 34 -37

Extraíu-se o trifosfato de nucleótilo de alcinilamino 49 (10 micromole), a partir do Exemplo 3J) com água (0,050 ml) e diluiu-se com dimetilformamida (0,100 ml). Adicionou-se uma solução de éster de N-hidroxi-succinimida 2a (12,3 mg; 21 micromole; 2,1 eq., do Exemplo 15 E) em dimetilformamida (0,100 ml) e agitou-se a mistura a 50°C durante 4 horas. Adicionou-se hidróxido de amónia concentrado (0,25 ml) tapou-se hermeticamente o recipiente de reacção e manteve-se o aquecimento a 50°C durante mais 25 minutos. A solução

vermelha resultante diluiu-se para 10 ml com água e aplicou-se a uma coluna de DEAE-Sephadex G-25-120 (leito de 1 X 19 cm) que tinha sido equilibrada com TEAB aquoso 1,0 M de pH 7,6 (50 ml) e depois com TEAB aquoso 0,2 M de pH 7,6 (50 ml). Eluiu-se a coluna com um gradiente linear de TEAB aquoso de pH 7,6 variando desde 0,4 M (150 ml) até 0,7 M (150 ml). O processamento em coluna efectuou-se a 100 ml/h tendo-se recolhido fracções de 3 em 3 minutos. Controlou-se o eluente por absorvência a 498 nm (40 AUFS). Observou-se primeiro a eluição de duas bandas inferiores de sub-produtos seguindo-se a banda do produto principal com resolução a partir da linha de base. Combinaram-se as fracções em que se admitiu a existência de produto puro. Concentrou-se ($T < 30^{\circ}\text{C}$), fez-se a evaporação conjunta três vezes com etanol absoluto e depois extraíu-se com água (0,74 ml). Fez-se um exame da solução por absorção visível (Tris-tampão aquoso 50 mM de pH 8,2) e liofilizou-se. Uma solução diluída do produto apresentou um máximo de absorção a 487,5 nm. Admitindo para o produto um coeficiente de absorção igual ao do corante livre (72 600), o rendimento de nucleótido de alcinil-amino 37 marcado, foi de 4,2 micromole (42%).

O procedimento anterior proporcionou um terminante de cadeia marcado 37, por fluorescência em que Het representa 7-deazaguanina (k). Prepararam-se terminantes de cadeia marcados 34 (Het representa uracilo (h)), 35 (citosina (i)), e 36 (7-deaza-adenosina (j)) seguindo procedimentos semelhantes tendo-se feito o acoplamento de nucleótido-trifosfatos de alcinilamino 46, 42 e 51 com N-hidroxissuccinimidas 2d, 2c e 2b respectivamente. Também se preparam, pelos mesmos métodos, outros nucleótido-trifosfatos marcados por fluorescência.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo aperfeiçoado para a preparação de nucleotidos de alquinilamino, caracterizado por se ligar nucleotidos de iodo com um átomo de iodo ligado a um átomo de carbono na base heterocíclica com alquinilaminas terminais utilizando um catalisador de dicloreto de bis(trifenil-fosfina) paládio/iodeto cuproso, consistindo o aperfeiçoamento na utilização do catalisador de tetraquis (trifenil-fosfina) paládio(0)/iodeto cuproso.

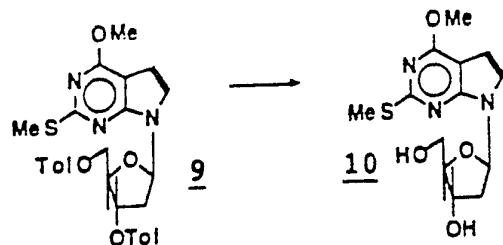
2.- Processo para a preparação de 2-tio-alcoxi-6-alcoxi-7-iodo-7-deazapurinas, caracterizado por se incluir o passo que consiste em tratar 2-tio-alcoxi-6-alcoxi-7-deazapurinas com N-iodo-succinimida para a introdução selectiva de iodo na posição 7.

4.

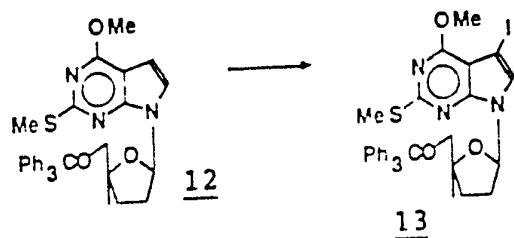
3.- Processo para a preparação de 5'-trifosfato de 7-(3-amino-1-propinil)-2',3'-dideoxi-guanosina, caracterizado por incluir as fases que consistem em:

(A) fazer contactar 6-metoxi-2-metil-tio-7-deazapurina com 1-clo-ro-2-deoxi-3,5-di-O-p-toluoil-D-ribofuranose na presença de hidreto de sódio;

(B) hidrolisar o produto éster 9 do passo (A), sob condições alcalinas, para se obter o diol 10;

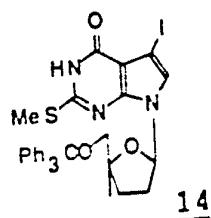


- (C) proteger a posição 5-OH no diol 10 com um grupo tritilo;
 (D) eliminar o grupo 3-OH mediante redução de um tionocarbonato intermediário com hidreto de estanho como agente redutor;
 (E) tratar a dideoxi-deazapurina 12 resultante do passo (D) com N-iodo-succinimida para formar o derivado 7-iodo 13;

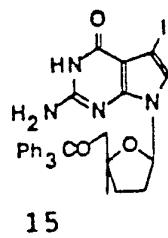


4.

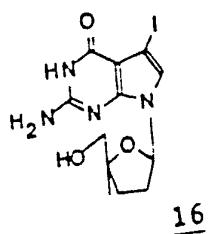
(F) fazer contactar o composto 13 com tiocresolato de sódio em hexa-metil-fosforamida para formar a 7-deazapurin-6-ona 14;



(G) tratar o composto 14 sucessivamente com ácido meta-cloroperoxibenzoíco e amoniaco para se obter a 7-deazaguanosina 15;



(H) ligar a N-propargiltrifluoro-acetamida ao composto 7-ido desprotegido 16 para se obter a 7-(3-trifluoro-acetamido-1-propinil)-2',3'-dideoxi-7-deazaguanosina;



• • •

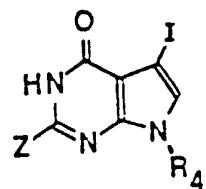
4.

e

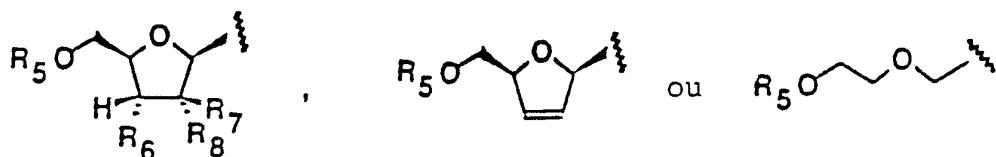
(I) converter o produto do passo (H) no 5'-trifosfato e, em seguida, eliminar o grupo protector.

4.- Processo para a preparação de 6-cloro-7-iodo-7-deazapurinas, caracterizado por se incluir a fase de tratamento de 6-cloro-7-deazapurinas com mono-cloreto de iodo para a introdução selectiva de iodo na posição 7.

5.- Processo de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por se obter 7-iodo-nucleotidos com a estrutura:



na qual Z representa um átomo de hidrogénio ou um grupo amino e R₄ representa um grupo de fórmula geral



em que R₅ representa um átomo de hidrogénio ou

PO_3H_2 , $\text{P}_2\text{O}_6\text{H}_3$, $\text{P}_3\text{O}_9\text{H}_4$ ou os sais correspondentes, e

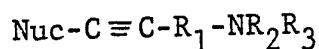
i) quando $\text{R}_7=\text{R}_8=\text{H}$, então $\text{R}_6=\text{H}, \text{OH}, \text{F}, \text{N}_3$ ou

NH_2 ; ou

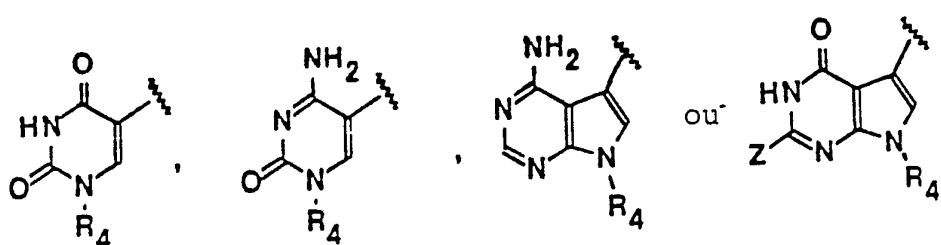
ii) quando $\text{R}_7=\text{H}$ e $\text{R}_8=\text{OH}$, então $\text{R}_6=\text{H}$ ou OH ; ou

iii) quando $\text{R}_7=\text{OH}$ e $\text{R}_8=\text{H}$, então $\text{R}_6=\text{OH}$.

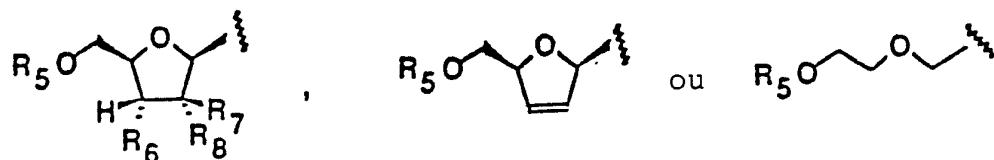
6.- Processo de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por se obter um nucleotido de alquinilamino com a estrutura



na qual R_1 representa uma parte de di-radical com 1 a 20 átomos e R_2 e R_3 representam, cada um, independentemente, um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ ou um grupo protector, e Nuc representa $\text{R}_4\text{-Het}$ com a estrutura



em que Z representa um átomo de hidrogénio ou um grupo amino e R_4 representa um grupo de fórmula geral



4.

em que

R_5 representa um átomo de hidrogénio ou

PO_3H_2 , $P_2O_6H_3$, $P_3O_9H_4$ ou os sais correspondentes, e

i) quando $R_7=R_8=H$, então $R_6=H, OH, F, N_3$ ou NH_2 ; ou

ii) quando $R_7=H$ e $R_8=OH$, então $R_6=H$ ou OH ; ou

iii) quando $R_7=OH$ e $R_8=H$, então $R_6=OH$.

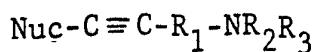
7.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por R_1 representar um grupo alquíleno C_1-C_{10} de cadeia linear.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por R_1 representar um grupo $-CH_2-$

9.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por R_2 representar um átomo de hidrogénio e R_3 representar um átomo de hidrogénio ou um grupo protector.

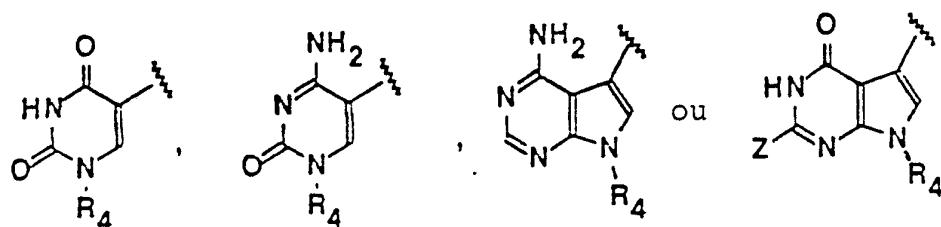
10.- Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por R_4 representar uma cadeia terminada por açúcar.

11.- Processo de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por se obter um nucleotido de alquinilamino marcado com a estrutura:

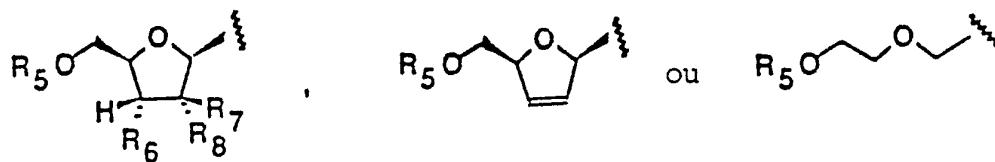


4.

na qual R_1 representa uma parte de di-radical com 1 a 20 átomos,
 R_2 representa um átomo de hidrogénio ou um grupo alquilo C_1C_4 ou um grupo protector,
e Nuc representa R_4 -Het com a estrutura



em que Z representa um átomo de hidrogénio ou um grupo amino, e
 R_4 representa um grupo de fórmula geral



em que

R_5 representa um átomo de hidrogénio ou PO_3H_2 ,
 $P_2O_6H_3$, $P_3O_9H_4$ ou os sais correspondentes, e
i) quando $R_7=R_8=H$, então $R_6=H, OH, F, N_3$ ou NH_2 ; ou
ii) quando $R_7=H$ e $R_8=OH$, então $R_6=H$ ou OH ; ou
iii) quando $R_7=OH$ e $R_8=H$, então $R_6=OH$
e R_3 representa um grupo informante.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por R₃ representar um grupo fluorescente,

Lisboa, 2 de Julho de 1987
O Agente Oficial da Propriedade Industrial

R e s u m o

"Processo para a preparação de nucleotidos de alquinilamino"

A presente invenção refere-se à preparação de nucleotidos de iodo mediante introdução selectiva de iodo na posição 7 ou por tratamento com N-iodo-succinimida ou com mono-cloreto de iodo.

Em seguida preparam-se os nucleotidos de alquinilamino, ligando os nucleotidos de iodo anteriores com um átomo de iodo ligado a um átomo de carbono na base heterocíclica com alquinil-aminas terminais utilizando um catalisador de dicloreto de bis(trifenil-fosfina) paládio/iodeto cuproso.

Lisboa, 2 de Julho de 1987
O Agente Oficial da Propriedade Industrial