
Octrooiraad



⑫^A **Terinzagelegging** ⑪ **8700724**

Nederland

⑲ NL

- ⑤⁴ **Poly(deoxyribonucleotiden), farmaceutische samenstellingen, gebruik en bereiding van de poly(deoxyribonucleotiden).**
- ⑤¹ Int.CI⁴: C07H 21/04, A61K31/70.
- ⑦¹ Aanvrager: Technische Universiteit Eindhoven te Eindhoven.
- ⑦⁴ Gem.: Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.
Vereenigde Octroobureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

-
- ②¹ Aanvraag Nr. 8700724.
- ②² Ingediend 27 maart 1987.
- ③² --
- ③³ --
- ③¹ --
- ⑥² --

-
- ④³ Ter inzage gelegd 17 oktober 1988.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Titel: Poly(deoxyribonucleotiden), farmaceutische samenstellingen, gebruik en bereiding van de poly(deoxyribonucleotiden).

De uitvinding heeft betrekking op poly(deoxyribonucleotiden) uit 2 of meer deoxyribonucleoside eenheden die door fosfaatgroepen met elkaar zijn verbonden.

Alle levende organismen bevatten deoxyribonucleïnezuur (DNA) in de vorm van grote molekulen, opgebouwd uit eenheden die als deoxyribonucleosiden worden aangeduid. Elke deoxyribonucleoside eenheid bestaat uit een suikermolekuul, nl. β -D-2-deoxyribofuranose, aan het C¹ atoom waarvan een base uit de groep, bestaande uit adenine, guanine, thymine en cytosine is gebonden via het N⁹ atoom van adenine of guanine of het N¹ atoom van thymine of cytosine. In het polymere DNA zijn de deoxyribonucleoside eenheden via fosfaatgroepen tussen de 3'-OH groep van het ene nucleoside en de 5'-OH groep van het andere nucleoside met elkaar verbonden. De uit een fosfaatgroep, suikermolekuul en base bestaande schakels van het polymere DNA worden deoxyribonucleotiden, of ook wel kortweg nucleotiden genoemd. Het polymere DNA fungeert in alle levende wezens als drager van genetische informatie, welke bepaald wordt door de volgorde (of sequentie) van de basen in het molekuul.

Sedert de structuuronderzoeken van Watson en Crick in het begin der vijftiger jaren is duidelijk dat DNA in de natuur voorkomt in de vorm van een uit twee strengen bestaande dubbele helix (of duplex), die samengehouden wordt door waterstofbindingen tussen complementaire basen, d.w.z. tussen A en T en tussen G en C. Inmiddels zijn verschillende duplex-vormen van DNA bekend geworden, waarvan de door Watson en Crick gevonden B-vorm het bekendst is. Karakteristiek is onder andere het feit dat de beide complementaire strengen in tegenge-

stelde richting lopen, d.w.z. antiparallel zijn. De stabiliteit van de duplex wordt door verschillende factoren bepaald, zoals de lengte van de duplex, de verhouding tussen het aantal C-G paren (met 3 waterstofbruggen per paar) en A-T paren (met slechts 2 waterstofbruggen per paar), de sequentie van de basen en de elektrostatische afstoting van de onder fysiologische condities negatief geladen fosfaatgroepen. Electrostatistische interactie tussen de fosfaatgroepen en anorganische kationen zoals Mg^{2+} of basische eiwitten zoals histonen leidt tot een hogere stabiliteit van de duplex. Een maat voor de stabiliteit van de duplex is de smeltemperatuur T_m , die bepaald kan worden door de absorptie bij 260 nm tegen de temperatuur uit te zetten. Een hoge T_m waarde duidt op een hoge stabiliteit van de duplex.

Inmiddels zijn verschillende methoden ontwikkeld waarmee DNA molekulen kunnen worden gesynthetiseerd. Een elegante, automatisch uitvoerbare methode maakt gebruik van een drager van "controlled pore glass" (CPG) waaraan covalent via een spacer een eerste nucleoside is gebonden. Dit nucleoside is verbonden via de 3'-OH groep en heeft een door de zuurlabiele di-p-methoxytrityl (DMTr) groep beschermde 5'-OH groep. In evenzovele cycli wordt hieraan een schakel van het te bereiden DNA toegevoegd. Elke cyclus start met een verwijdering van de 5'-OH beschermende DMTr groep en reactie met een door behandeling met tetrazool geactiveerde verbinding met formule 3 van het formuleblad, waarin NR_2 een di-isopropylamino groep voorstelt, D de 5'-OH beschermende DMTr groep voorstelt, een X* thymine, benzoyladenine, benzoylcytosine of isopropylcarbonylguanine voorstelt. Nadat niet gereageerd hebbend substraat door acetylering is geblokkeerd, wordt de methylfosfietgroep met jood geoxydeerd tot een methylfosfaatgroep voordat de volgende cyclus wordt uitgevoerd. Nadat alle gewenste cycli hebben plaatsgevonden worden de fosfaatbeschermende methylgroepen verwijderd door

8700724

behandeling met thiofenol, wordt de binding aan de CPG drager verbroken door behandeling met ammoniak en worden de base-beschermende groepen verwijderd. Voor alle duidelijkheid wordt opgemerkt, dat de bovenstaand beschreven methode slechts één van de vele mogelijke synthese varianten is. Er bestaan ook synthese varianten met andere beschermende groepen en varianten waarbij de bouwstenen geen fosfiet-, maar een fosfaatgroep bevatten.

Men heeft reeds verscheidene pogingen gedaan om poly(deoxyribonucleotiden) te synthetiseren zonder negatief geladen fosfaatgroep. Miller et al, J.A.C.S. 93 (1971) 6657-6665 en Pless en Ts'O, Biochem. 16 (1977) 1239-1250 beschrijven experimenten met alkylfosfotriesters, met name de bereiding van $d([Tp(OEt)]_7T)$ dat tussen de nucleoside eenheden ethylfosfaatgroepen bevat. Het reactieproduct bestaat als gevolg van de chirale fosforatomen uit een mengsel van 128 diastereomeren, die bij hybridisatie met poly(deoxyadenylate) duplexen met uiteenlopende stabiliteiten vormen. Opgemerkt wordt dat geen overeenkomstige methylfosfotriesters zijn beschreven en in het algemeen bij gebreke van een uitvoerbare synthese-methode niet konden worden bereid.

Dezelfde onderzoekers zijn vervolgens overgegaan op een synthese van poly(deoxyribonucleotiden) waarin methylfosfonaatgroepen met de formule $-O-P(O)(CH_3)-O-$ als verbindingselementen tussen de nucleoside eenheden fungeren: zie Miller et al, Biochimie 67 (1985) 769-776; Miller et al, Jerus. Symp. Quantum Chem. Biochem. 18 (1985) 207-219; Miller et al, in "Nucleic Acids: The Vectors of Life", eds. Pullman en Jortner, Reidel Publishing Company, (1983), 521-535; Ts'O et al, in "Development of Target-Oriented Anticancer Drugs", eds. Cheng et al, Raven Press, New York (1983), 189-206; Agris et al, Biochem. 25 (1986) 6268-6275.

Bij hybridisatie-experimenten van dergelijke methylfosfonaatoligonucleotiden met complementaire normale

oligonucleotiden is gebleken dat duplexen worden gevormd, waarbij de stabiliteit daarvan groter is in het geval van tetranucleotiden dan in het geval van dinucleotiden. De duplex stabiliteit neemt echter bij langere molekulen
5 weer af en is bij oligonucleotiden met meer dan 9 nucleoside eenheden lager dan in het geval van dinucleotiden. Kennelijk kan een methylfosfonaat DNA streng niet gemakkelijk de rechtsdraaiende conformatie van de suiker-fosfaat ruggegraat aannemen die voor de vorming van een stabiele
10 duplex nodig is.

Door onze groep is het hexanucleotide $d([Tp(OMe)]_5T)$ gesynthetiseerd, waarin methylfosfaatgroepen met de formule $-O-P(O)(OMe)-O-$ als verbindingselementen tussen de nucleoside eenheden fungeren. Zoals beschreven is
15 door Koole et al, Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, serie B, 89 (1986) 51-55 is deze stof in staat om met zichzelf een stabiele parallelle duplex te vormen, d.w.z. met waterstofbruggen tussen thymine basen. De T_m waarde van de uit een mengsel
20 van diastereomeren bestaande stof ligt bij ongeveer $67^\circ C$. Doordat de stof alleen thymine basen bevat, welke geen primaire aminogroep dragen, kon de stof worden bereid door methylering van de fosfaatgroepen met methylmethaansulfonaat als beschreven door Rhaese en Freese,
25 Biochim. Biophys. Acta 190 (1969) 418-433.

Inmiddels is door McBride et al, J.A.C.S. 108 (1986) 2040-2048 het gebruik van base beschermende amidinegroepen in de synthese van oligonucleotiden voorgesteld, die gemakkelijk en selectief kunnen worden verwijderd
30 door behandeling met 1,2-ethaandiamine/fenol/water zonder dat tegelijkertijd gemethyleerde fosfaatgroepen worden ontschermd. Daarvan gebruik makend hebben wij nu een synthesemethode ontwikkeld waarmee elk gewenst poly(deoxyribonucleotide) met gemethyleerde fosfaatgroepen kan
35 worden bereid. Met behulp van deze synthesemethode hebben wij een aantal poly(deoxyribonucleotiden) met gemethyleerde

fosfaatgroepen kan worden bereid. Met behulp van deze
synthesemethode hebben wij een aantal poly(deoxyribonucleo-
tiden) met gemethyleerde fosfaatgroepen bereid en bij
hybridisatie-experimenten verrassenderwijze vastgesteld
5 dat de verbindingen met complementaire DNA molekulen
antiparallelle duplexen vormen waarvan de stabiliteit
met toenemende ketenlengte blijft stijgen. Gezien de
bij methylfosfaat polynucleotiden gevonden instabiliteit
van duplexen met grotere ketenlengtes is het inderdaad
10 verrassend dat vervanging van de aan fosfor gebonden
methylgroep door een methoxygroep zo'n drastisch effect
heeft op de stabiliteit van de duplex. Duplexen met
lengtes van 2, 3, 6 en 8 nucleoside eenheden per keten
vertonen in het geval van methylfosfaat polynucleotiden
15 T_m waarden van respectievelijk ca. 30°C, 41°C, 67°C
en 85°C.

Van deze verrassend hoge stabiliteit, met name
in het geval van langere molekulen, kan op vele wijzen
gebruik worden gemaakt, bijv. in hybridisatie stappen
20 waarbij behoefte bestaat aan de vorming van stabiele
duplex molekulen door een methylfosfaat polynucleotide
als probe te gebruiken. Dergelijke hybridisatiestappen
maken niet alleen deel uit van verscheidene wetenschappelijke
en toepassingsgerichte DNA recombinant procedures, maar
25 kunnen ook in diagnostische toepassingen worden gebruikt
om de aanwezigheid van een bepaalde DNA sequentie in
te analyseren monsters vast te stellen. Doordat ook
langere duplex moleculen stabiel zijn kunnen molekulen
worden gebruikt met een basen sequentie die specifiek
30 is voor een bepaald type DNA, bijvoorbeeld voor het
DNA van een bepaalde bacterie, een bepaald virus, een
bepaalde eukaryotische parasiet, een bepaald type tumorcel
of in algemenere zin van cellen met een veranderd DNA,
zoals optreden bij dementie, spierdystrofie, autoimmuunziekten
35 en andere ziekte-toestanden. Behalve voor diagnostische
doeleinden kunnen de methylfosfaat poly(deoxyribonucleotiden)

volgens de uitvinding ook voor therapeutische doeleinden worden gebruikt. Doordat ze met het in de cel aanwezige DNA stabiele duplexen vormen, met een T_m waarde boven de lichaamstemperatuur in het geval van ketenlengtes 5 van 3 of meer nucleoside eenheden, zijn ze in staat om replicatie (en dus celvermeerdering) en transcriptie (en dus een normale werking van de cel) te verstoren, waarbij in het geval van stoffen met een voor bepaald DNA specifieke basen sequentie een gerichte behandeling 10 van bacteriële of virale infecties, van eukaryotische parasieten, van kankercellen en andere met veranderd DNA gepaard gaande ziektoestanden, zoals dementie, spierdystrofie en autoimmuunziekten kan worden gerealiseerd. De methylfosfaat poly(deoxyribonucleotiden) volgens 15 de uitvinding blijken in het lichaam niet te worden afgebroken en kunnen, dankzij hun niet anionogene karakter, gemakkelijk door celmembranen passeren, zodat ze in werkzame vorm het in de cel aanwezige DNA kunnen bereiken. Ook voor genterapeutische doeleinden zouden de verbindingen 20 volgens de uitvinding toegepast kunnen worden. Wat de te behandelen organismen betreft is de uitvinding niet beperkt tot de mens, maar evenzeer van toepassing bij dieren en planten.

Verder zou gedacht kunnen worden aan een gebruik 25 maken van de eigenschap dat de verbindingen een temperatuurafhankelijke UV-absorptie vertonen, welke door een keuze van de lengte van het molecuul kan worden ingesteld op het gewenste temperatuurgedrag.

De uitvinding wordt op de eerste plaats belichaamd 30 in de nieuwe verbindingen zelf, d.w.z. in poly(deoxyribonucleotiden) uit 2 of meer deoxyribonucleoside eenheden die door fosfaatgroepen met elkaar zijn verbonden, waarbij ten minste een deel van de fosfaatgroepen is gemethyleerd, met uitzondering van hexa thymidine penta methylfosfaat 35 en di thymidine methylfosfaat.

Opgemerkt wordt dat voor hexa thymidine penta

methyfosfaat geen bescherming wordt gevraagd, omdat deze stof op zichzelf bekend is uit het eerder genoemde artikel van Koole et al, en voor di thymidine methyfosfaat geen bescherming wordt gevraagd omdat deze stof op zichzelf
5 bekend is uit FEBS Letters 189 (1985) 315-317.

Langere molekulen hebben de voorkeur vanwege een hogere stabiliteit van de duplex en vanwege de mogelijkheid om specifiek te zijn voor bepaald DNA. Molekulen met 4 of meer nucleoside eenheden hebben een T_m waarde,
10 die duidelijk boven de lichaamstemperatuur van zoogdieren, met inbegrip van de mens ligt, en zijn daarom geprefereerd. Bij ketenlengtes van 8 of meer, liefst 10 of meer, bijvoorbeeld 15 tot 18 nucleoside eenheden is een grote specificiteit voor bepaald DNA bereikbaar.

15 Om een hoge stabiliteit te bereiken is niet altijd nodig dat alle fosfaatgroepen gemethyleerd zijn en om economische redenen kan het gewenst zijn dat slechts een deel van de stof methyfosfaatgroepen bevat. De voorkeur hebben echter verbindingen die geen geladen
20 fosfaatgroepen bevatten, omdat deze de hoogste duplex stabiliteit bezitten en het gemakkelijkst door celmembranen passeren.

De voorkeur gaat uit naar verbindingen met formule 1 van het formuleblad, waarin n een geheel getal van
25 1 of groter, bij voorkeur ten minste 3 en liefst ten minste 7 voorstelt, R^1 en R^2 onafhankelijk van elkaar waterstof, $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-COCH_3$ of $-PO(OCH_3)_2$ voorstellen, en X telkens, onafhankelijk van elkaar, een base uit de groep bestaande uit adenine, guanine, thymine en
30 cytosine voorstelt.

De poly(deoxyribonucleotiden) volgens de uitvinding hebben bij voorkeur een basensequentie die specifiek is voor het DNA van een bacterie of virus of eukaryotische parasiet of voor het DNA van een tumorcel.

35 De uitvinding wordt verder belichaamd in farmacologische samenstellingen welke naast ten minste één

voor geneeskundige toepassing geschikte drager, ten minste één poly(deoxyribonucleotide) volgens de uitvinding bevatten. De vorm van deze pharmaceutische samenstellingen is afhankelijk van de gekozen toedieningsroute. De keuze
5 van de drager en andere gebruikelijke componenten van de samenstelling worden geacht binnen het bereik van de deskundige te liggen. De verbindingen volgens de uitvinding zullen bij voorkeur in de vorm van oplossingen, emulsies of suspensies voor bijvoorbeeld intraveneuze,
10 intramusculaire of intralesionale toediening worden gebruikt.

De uitvinding wordt mede belichaamd in het gebruik van de nieuwe verbindingen volgens de uitvinding, bijvoorbeeld in therapie voor bacteriële of virale infecties of eukaryotische
15 parasieten, in therapie voor kanker of andere met veranderd DNA gepaard gaande ziekte toestanden, zoals dementie, spierdystrofie en autoimmuunziekten, voor diagnostische doeleinden en in ruimere zin voor hybridisatie doeleinden.

Ook wordt de uitvinding belichaamd in een werkwijze
20 voor het bereiden van de nieuwe verbindingen volgens de uitvinding, omvattende

- a. bereiding van een deoxyribonucleoside met formule 2 van het formuleblad, waarin Y een 3'-OH beschermende groep voorstelt, en X* thymine dan wel adenine, guanine
25 of cytosine met een basebeschermende amidinegroep voorstelt,
- b. bereiding van een of meerdere verbindingen met formule 3 van het formuleblad, waarin NR₂ een activeerbare leaving group voorstelt, D een 5'-OH beschermende groep voorstelt, en X* thymine dan wel adenine, guanine
30 of cytosine met een basebeschermende amidine groep voorstelt,
- c. activering van een verbinding met formule 3 en koppeling aan de vrije 5'-OH groep van de verbinding met formule 2,
- d. oxydatie van de fosfietgroep in het verkregen
35 reactieproduct tot een fosfaatgroep,
- e. verwijdering van de 5'-OH beschermende groep

D,

f. ketenverlenging, indien gewenst, door volgens de stappen c, d en e telkens een nieuwe deoxyribonucleoside methylfosfaatschakel toe te voegen,

g. omzetting, indien gewenst, van de 5'-OH groep
5 in een groep $-OR^1$,

h. omzetting, indien gewenst, van de beschermde 3'-OH groep in een groep $-OR^2$, en

i. verwijdering, indien aanwezig, van de basebeschermende amidinegroepen.

10 In deze werkwijze kan in stap a elke geschikte 3'-OH beschermende groep worden gebruikt. Bij voorkeur stelt Y echter een acetylgroep voor. In stap b kan elke geschikte 5'-OH beschermende groep worden gebruikt, maar de voorkeur gaat uit naar een di-p-methoxytritylgroep.

15 De "leaving group" NR_2 is een groep die een grote stabiliteit bezit maar tevens gemakkelijk geactiveerd kan worden. De voorkeur heeft een di-isopropylaminogroep welke gemakkelijk met heterocyclische verbindingen, zoals liefst tetrazool, kan worden geactiveerd.

20 In de onderhavige werkwijze wordt gebruik gemaakt van een amidinegroep voor het beschermen van de basen adenine, guanine en cytosine. Deze amidine groep heeft bij voorkeur de formule $-N=C(R^3)-NR^4R^5$, waarin R^3 en R^4 onafhankelijk van elkaar waterstof of alkyl met 1-6
25 koolstofatomen voorstellen en R^5 alkyl met 1-6 koolstofatomen voorstelt. R^4 en R^5 of R^3 en R^5 kunnen echter ook samen met het stikstofatoom resp. de stikstof- en koolstofatomen waaraan ze gebonden zijn, een heterocyclische ring met 4-7 atomen in de ring vormen.

30 Liefst heeft de basebeschermende amidinegroep de formule $-N=C(CH_3)-N(CH_3)_2$, welke groep geïntroduceerd kan worden door een omzetting met de verbinding 1-dimethyl-amino-1,1-dimethoxy-ethaan.

De verwijdering van deze amidinegroep in stap
35 i geschiedt bij voorkeur met ethyleendiamine.

8700724

Ook andere bereidingsmethoden kunnen echter worden toegepast, bijv. een geautomatiseerde fosfiettriestermethode als eerder is beschreven, waarbij echter een modificatie nodig is om te verhinderen dat bij het
5 losmaken van het gesynthetiseerde molecuul van de vaste drager ketenbreuk ten gevolge van de aanwezige methylfosfaat groepen optreedt. De gebruikelijke behandeling met ammoniak is om deze reden niet geschikt. Door een ander reagens te gebruiken dat het molecuul losmaakt
10 van de drager zonder de integriteit van het gesynthetiseerde molecuul aan te tasten, of door een andere spacer te gebruiken, die op het gewenste moment selectief verwijderbaar is zonder de integriteit van het gesynthetiseerde molecuul aan te tasten, kan dit probleem worden overwonnen.

15 Soortgelijke overwegingen gelden voor andere methoden, zoals de bekende fosfaattriestermethode: door gepaste modificaties zullen deze bruikbaar kunnen worden gemaakt voor de bereiding van de poly(deoxyribonucleotiden) volgens de uitvinding.

20 De uitvinding zal nu aan de hand van een experimenteel gedeelte nader worden toegelicht.

Bereiding van: d(acAp(OMe)Ap(OMe)Aac) met formule 4
en d(acAp(OMe)Ap(OMe)Ap(OMe)Aac) (zie reactieschema)

25

Uitgaande van het fosforamidiet met formule 5, bereid volgens McBride et al. (J. Am. Chem. Soc. 105 (1986) 2040), en het gemodificeerde nucleoside met formule 6 wordt in een driestapssynthese het dinucleotide met
30 formule 7 bereid. De drie stappen zijn: 1. koppeling; 2. oxydatie van fosfiet naar fosfaat; 3. ontscherming van het 5'-uiteinde (detritylering). De drie stappen worden als volgt uitgevoerd:

35 (1) Koppeling

De verbindingen (5) en (6) worden in equimolaire

0700724

hoeveelheden bijeengebracht. Tweemaal wordt droge toluen toegevoegd om alle water azeotropisch te verwijderen. De reagentia worden daarna opgelost in droge pyridine. Door toevoeging van 5 equivalenten tetrazool start de 5 reaktie. Na 1 uur is de omzetting volledig.

(2) Oxydatie

Het fosfiet wordt geoxydeerd door toevoeging
10 van I₂ (1,5 equivalent), opgelost in acetonitrile/lutidine/water (3:2:1 volumeverhouding). Na 10 minuten wordt ethylacetaat aan het reaktiemengsel toegevoegd. Vervolgens wordt geextraheerd met een 1% oplossing van NaHSO₃ in water.

15 De organische fase wordt gedroogd, gefiltreerd, en geconcentreerd totdat een visceuze olie ontstaat. Zuivering van het produkt vindt plaats door middel van kolomchromatografie met dichloormethaan/methanol (95:5) als eluens. Opbrengst: 84%.

20 R_f (dichloormethaan/methanol 90:10) : 0.40.
R_f (dichloormethaan/methanol 95:5) : 0.05.

(3) Detritylering

25 Het produkt van de oxydatiereaktie wordt opgelost in ijsazijn/water (4:1), waarna 2 uur wordt geroerd bij 50°C. Daarna wordt 5% ammoniumacetaat in water toegevoegd waardoor dimethoxytrityl alcohol precipiteert. Door filtratie wordt het neerslag verwijderd. Zuivering
30 van het produkt wordt uitgevoerd door kolomchromatografie. Opbrengst aan (7) : 81%.
R_f (dichloormethaan/methanol 90:10) : 0.26.

Uitgaande van (7) kan de driestapssynthese herhaald
35 worden, waardoor het trinucleotide (8) wordt verkregen. Een volgende herhaling levert het tetranucleotide (9)

op.

Tijdens de synthese van het trinucleotide werd gevonden:

R_f van het produkt na oxydatie (dichloormethaan/methanol
5 90:10) : 0.24.

R_f na detritylering (8) (dichloormethaan/methanol 90:10)
: 0.14.

Tijdens de synthese van het tetranucleotide werd gevonden:

10 R_f van het produkt na oxydatie (dichloormethaan/methanol
95:5) : 0.09.

R_f na detritylering (9) (dichloormethaan/methanol 90:10)
: 0.11.

15 Zowel (8) als (9) worden aan het 5'-uiteinde
geacetyleerd door reactie met een tweevoudige overmaat
aan azijnzuuranhydride in droge pyridine. De amidine
groepen op de adenine basen worden volgens het voorschrift
van McBride et al. (J. Am. Chem. Soc. 108, 2040) verwijderd
20 door reactie met 1,2-ethaandiamine/fenol/water.

De produkten worden met behulp van tweedimensionale
dunne laag chromatografie in zuivere vorm verkregen.

Ter vergelijking werd een niet gemodificeerd
trinucleotide d(ApApA) bereid via de standaard fosforami-
25 diet route op een geautomatiseerde DNA synthesizer.

Vergelijking van de verbindingen

Neutrale oplossingen in water van d(acAp(OMe)Ap(OMe)Aac)
30 en d(ApApA) vertoonden vrijwel identieke UV absorptiespectra
(fig. 1). In beide gevallen lag het typerende absorptie-
maximum bij 257 nm. Voor de verbinding volgens de uitvinding
lag het minimum bij 230 nm; was $A_{250}/A_{260} = 0.94$; en
was $A_{280}/A_{260} = 0.12$. Voor het normale trinucleotide
35 lag het minimum bij 236 nm; was $A_{250}/A_{260} = 1.08$; en
was $A_{280}/A_{260} = 0.22$.

Hybridisatie-proven met poly(dT) omvatten een

0763724

onderzoek van de UV hyperchromiciteit als functie van de temperatuur van het monster. De verbinding volgens de uitvinding vormde met poly(dT) een duplex, die dissocieerde bij een smeltemperatuur T_m van 41°C . De duplex
5 van d(ApApA) met poly(dT) dissocieerde bij een T_m van 20°C onder dezelfde proefcondities (fig. 2).

Uit fig. 2 blijkt dat de smeltovergangen in beide gevallen even scherp zijn, d.w.z. de helix \rightleftharpoons coil overgang was in beide gevallen binnen een temperatuurbereik
10 van ongeveer 20°C voltooid. De vier verschillende diastereomeren van de verbinding volgens de uitvinding hebben dus alle dezelfde T_m waarde van 41°C , waaruit geconcludeerd kan worden dat de configuratie van de methylfosfaatgroepen (R_p en S_p) geen invloed op de stabiliteit van de duplex
15 heeft.

Verder blijkt uit fig. 2 dat methylering van de fosfaatgroepen een verschuiving van de smeltekromme van $+21^\circ\text{C}$ geeft.

Soortgelijke experimenten lieten zien dat de
20 T_m waarde van verbindingen volgens de uitvinding stijgt met toenemende lengte van de molekulen. De T_m waarde van een duplex met een dinucleotide volgens de uitvinding lag bij ongeveer 30°C , terwijl duplexen met een hexanucleotide volgens de uitvinding een T_m waarde van ongeveer
25 67°C bezaten en duplexen met een octanucleotide volgens de uitvinding een T_m waarde van ongeveer 85°C bezaten.

Uit fig. 3 blijkt dat de T_m waarde van de verbindingen volgens de uitvinding bij stijgende ketenlengte toeneemt, terwijl de fosfonaten (kromme met open vierkanten) met
30 grotere ketenlengtes steeds minder stabiele duplexen vormen.

C O N C L U S I E S

1. Poly(deoxyribonucleotiden) uit 2 of meer deoxy-
ribonucleoside eenheden die door fosfaatgroepen met
elkaar zijn verbonden, waarbij ten minste een deel van
de fosfaatgroepen is gemethyleerd, met uitzondering
5 van hexa thymidine penta methylfosfaat en di thymidine
methylfosfaat.
2. Poly(deoxyribonucleotiden) volgens conclusie
1 welke ten minste 4 deoxyribonucleoside eenheden bevatten.
3. Poly(deoxyribonucleotiden) volgens conclusie
10 2 welke ten minste 8 deoxyribonucleoside eenheden bevatten.
4. Poly(deoxyribonucleotiden) volgens conclusie
1, beantwoordend aan formule 1 van het formuleblad,
waarin n een geheel getal van 1 of groter voorstelt,
R¹ en R² onafhankelijk van elkaar waterstof, -CH₃, -C₂H₅,
15 -COCH₃ of -PO(OCH₃)₂ voorstellen, en X telkens, onafhanke-
lijk van elkaar, een base uit de groep bestaande uit
adenine, guanine, thymine en cytosine voorstelt.
5. Poly(deoxyribonucleotiden) volgens conclusie
4, waarbij n een geheel getal van ten minste 3 voorstelt.
- 20 6. Poly(deoxyribonucleotiden) volgens conclusie
5, waarbij n een geheel getal van ten minste 7 voorstelt.
7. Poly(deoxyribonucleotiden) volgens conclusie
3 of conclusie 6, waarvan de basensequentie specifiek
is voor het DNA van een bacterie of virus of eukaryotische
25 parasiet of voor het DNA van een tumorcel.
8. Pharmaceutische samenstellingen welke naast ten
minste één voor geneeskundige toepassing geschikte drager,
ten minste één poly(deoxyribonucleotide) volgens een
van de conclusies 1-7 bevatten.
- 30 9. Gebruik van poly(deoxyribonucleotiden) volgens
een van de conclusies 1-7 voor therapeutische doeleinden.
10. Gebruik van poly(deoxyribonucleotiden) volgens
een van de conclusies 1-7 in therapie voor bacteriële

8700714

of virale infecties, eukaryotische parasieten, kanker, en andere met veranderd DNA gepaald gaande ziekte-toestanden, zoals dementie, spierdystrofie en autoimmuunziekten.

11. Gebruik van poly(deoxyribonucleotiden) volgens
5 een van de conclusies 1-7 voor diagnostische doeleinden.
12. Gebruik van poly(deoxyribonucleotiden) volgens
een van de conclusies 1-7 voor hybridisatie doeleinden.
13. Werkwijze voor het bereiden van poly(deoxyribo-
nucleotiden) volgens een van de conclusies 1-7, omvattende
10 a. bereiding van een deoxyribonucleoside met formule
2 van het formuleblad, waarin Y een 3'-OH beschermende
groep voorstelt, en X* thymine dan wel adenine, guanine
of cytosine met een basebeschermende amidinegroep voorstelt,
b. bereiding van een of meerdere verbindingen met
15 formule 3 van het formuleblad, waarin NR₂ een activeer-
bare leaving group voorstelt, D een 5'-OH beschermende
groep voorstelt, en X* thymine dan wel adenine, guanine
of cytosine met een basebeschermende amidinegroep voorstelt,
c. activering van een verbinding met formule 3 en
20 koppeling aan de vrije 5'-OH groep van de verbinding
met formule 2,
d. oxydatie van de fosfietgroep in het verkregen
reactieproduct tot een fosfaatgroep,
e. verwijdering van de 5'-OH beschermende groep
25 D,
f. ketenverlenging, indien gewenst, door volgens
de stappen c, d en e telkens een nieuwe deoxyribonucleoside
methylfosfaatschakel toe te voegen,
g. omzetting, indien gewenst, van de 5'-OH groep
30 in een groep -OR¹,
h. omzetting, indien gewenst, van de beschermde
3'-OH groep in een groep -OR², en
i. verwijdering, indien aanwezig, van de basebescher-
mende amidinegroepen.
- 35 14. Werkwijze volgens conclusie 13, waarbij in stap

a als 3'-OH beschermende groep Y en acetylgroep wordt gebruikt en in stap b als 5'-OH beschermende groep D een di-p-methoxytritylgroep en als "leaving group" NR₂ een di-isopropylaminogroep worden gebruikt.

- 5 15. Werkwijze volgens conclusie 13 of 14, waarbij in stap c de verbinding met formule 3 wordt geactiveerd met tetrazool.
16. Werkwijze volgens een of meer van de conclusies 13-15, waarbij de basen adenine, guanine en cytosine
10 worden beschermd door de primaire aminogroep om te zetten in een groep met de formule -N=C(R³)-NR⁴R⁵, waarin R³ en R⁴ onafhankelijk van elkaar waterstof of alkyl met 1-6 koolstofatomen voorstellen, R⁵ alkyl met 1-6 koolstofatomen voorstelt, of hetzij R⁴ en R⁵, hetzij R³ en R⁵
15 samen met het stikstofatoom waaraan ze gebonden zijn resp. samen met de stikstof- en koolstofatomen waaraan ze gebonden zijn, een heterocyclische ring met 4-7 atomen in de ring vormen.
17. Werkwijze volgens conclusie 16, waarbij de basen
20 adenine, guanine en cytosine worden beschermd door omzetting met de verbinding 1-dimethylamino-1,1-dimethoxy-ethaan, waardoor de primaire aminogroep van de basen wordt omgezet in een groep met de formule -N=C(CH₃)-N(CH₃)₂.
18. Werkwijze volgens een of meer van de conclusies
25 13-17, waarbij in stap i de basebeschermende amidinegroepen worden verwijderd door behandeling met ethyleendiamine.

FIG. 1

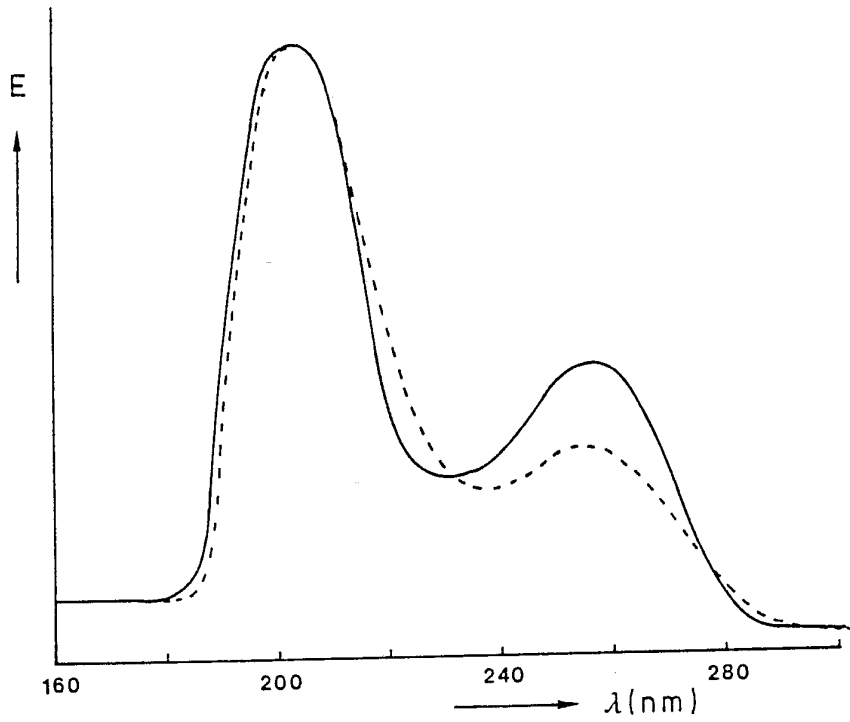
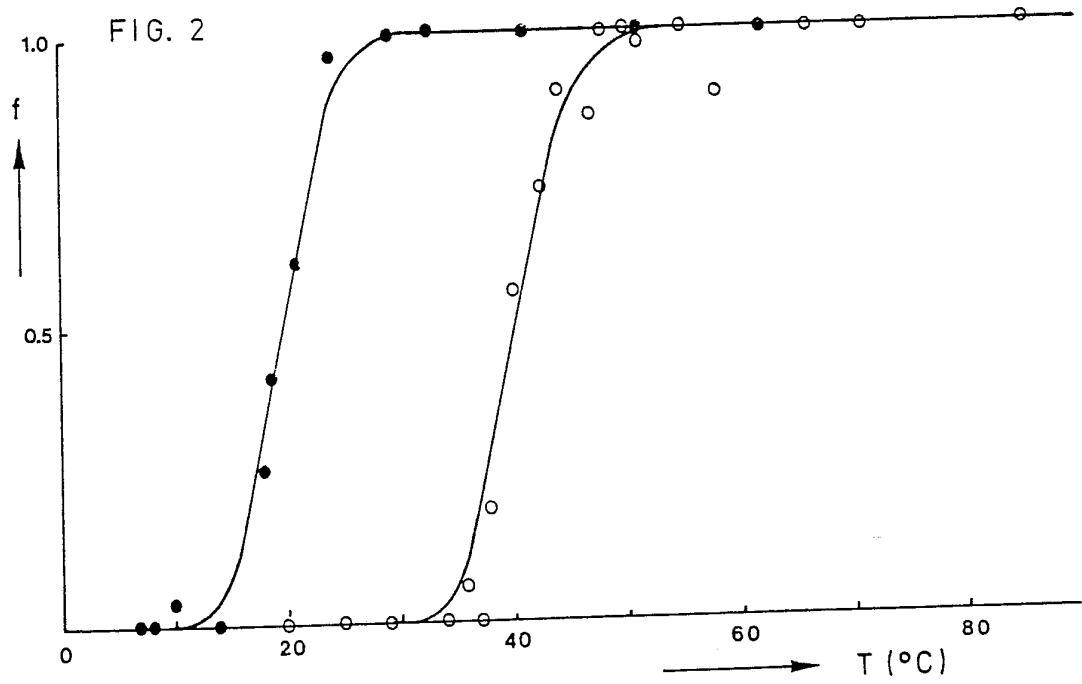
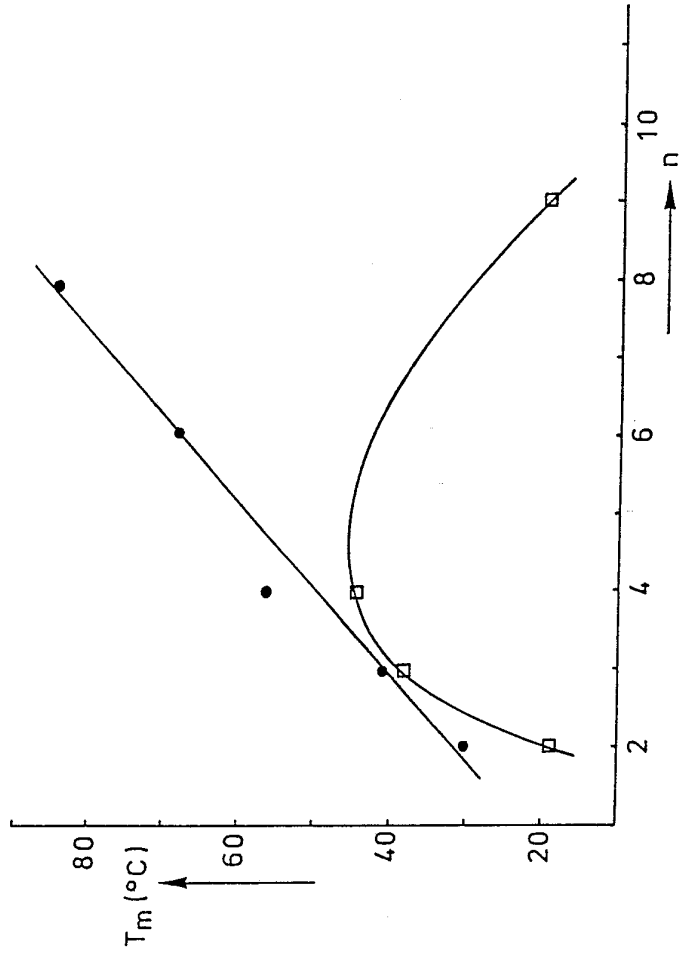


FIG. 2

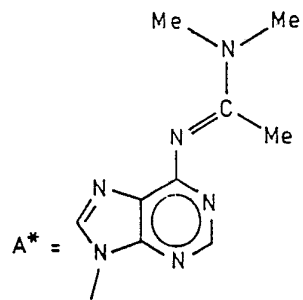
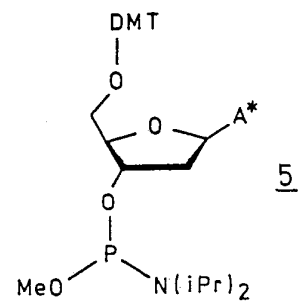
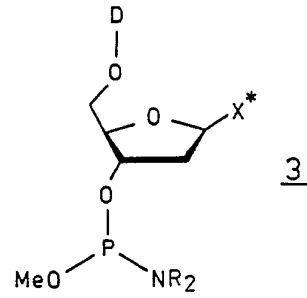
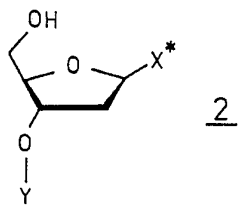
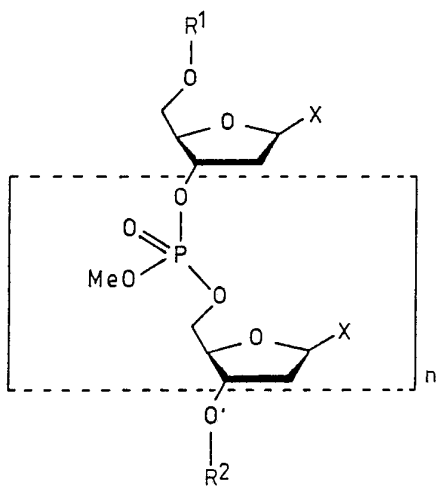


8700724

FIG. 3

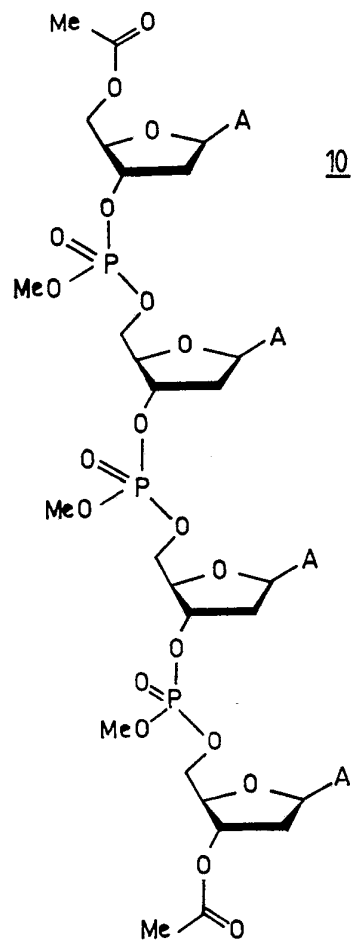
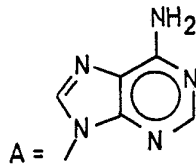
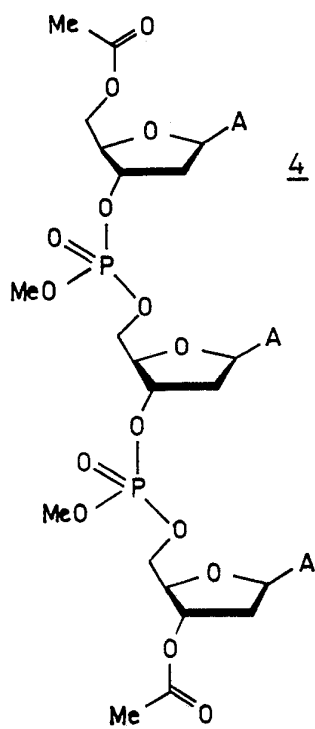


8700724



DMT = di-p-methoxytrityl
iPr = isopropyl

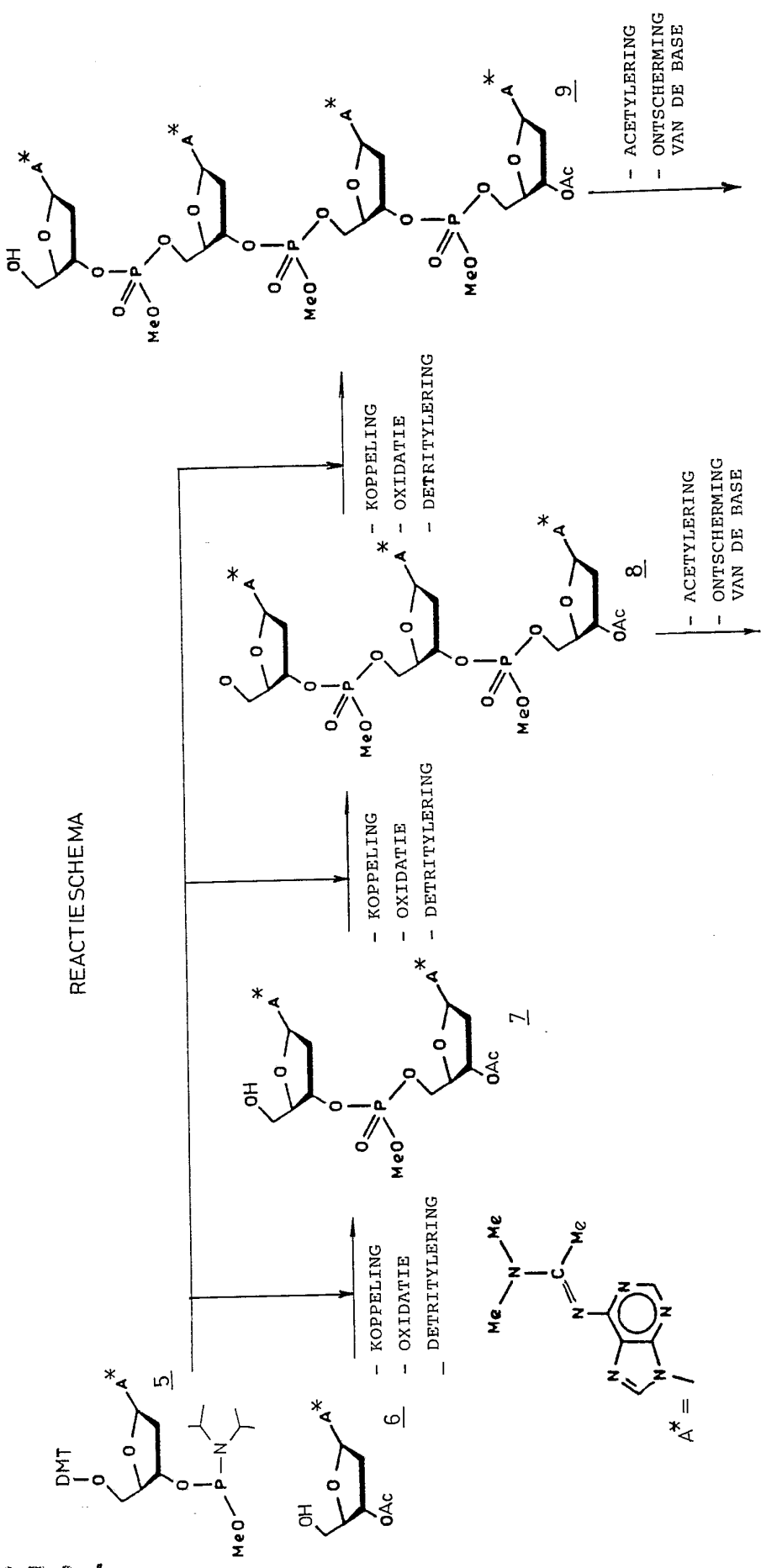
8700724



870 072 6

00
01
02
03
04
05

REACTIESCHEMA



d(acAp(OMe)Ap(OMe)Ap(OMe)Aac)

d(acAp(OMe)Ap(OMe)Aac)