

Primjer iz kemije

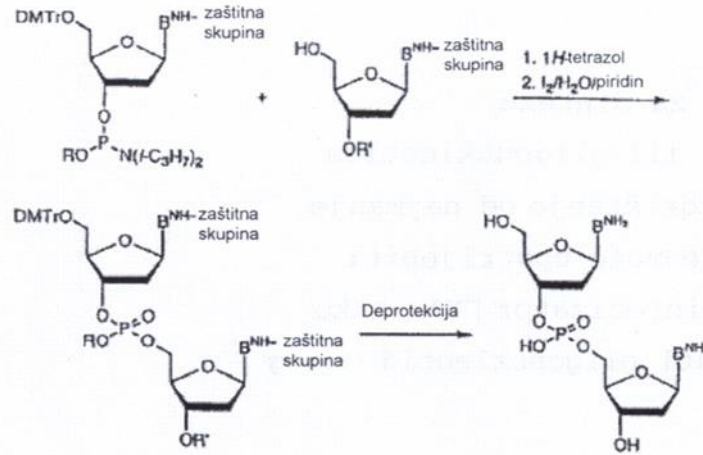
Postupak za kemijsku sintezu oligonukleotida

Područje izuma

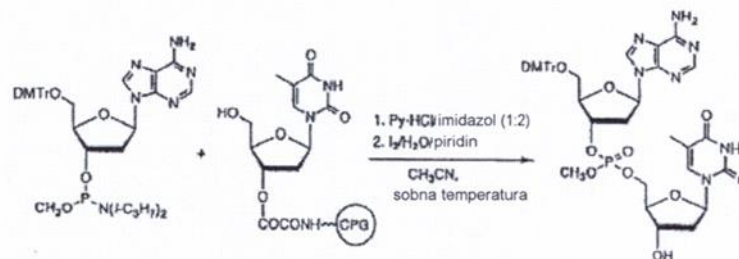
Predloženi izum odnosi se na postupak za kemijsku sintezu oligonukleotida. Osobito se predloženi izum odnosi na novi postupak kojim je moguća laka i pouzdana kemijska sinteza odsječaka DNA ili RNA dugog lanca iz nukleotida fosforamidita s nezaštićenim baznim dijelom kao jedinicom, kao također i na nove spojeve upotrijebljene u tom postupku.

Pozadina izuma

Postupak s fosforamiditom najčešće se koristi kao postupak za kemijsku sintezu oligonukleotida kao što su odsječci DNA i odsječci RNA (Nucleic Acids Research, 17:7059-7071, 1989). Općenito, u tom postupku s fosforamiditom kao ključna reakcija koristi se reakcija kondenzacije između nukleozida fosforamidita i nukleozida, uz upotrebu tetrazola kao sredstva za ubrzavanje reakcije. Budući da se ta reakcija obično odvija kompetitivno na obje hidroksilne skupine šećera i amino skupini nukleozidnog baznog dijela, za sintezu željenog nukleotida potrebna je selektivna reakcija samo na hidroksilnoj skupini šećera. S tim u skladu, sporednu reakciju na amino skupini se prema stanju tehnike sprečava zaštitom amino skupine, kako je prikazano u sljedećoj shemi reakcije:



Međutim, po završenoj sintezi, zaštitnu skupinu treba odstraniti, a za uvođenje i odstranjivanje spomenute zaštitne skupine potrebna je provedba složenih organskih reakcija i velike količine skupih i štetnih reagensa, što sa stajališta praktične upotrebe, gospodarske učinkovitosti, zaštite okoliša itd. predstavlja velik problem u provedbi ovog postupka iz prethodnog stanja tehnike. S tim u skladu, traži se postupak za kemijsku sintezu oligonukleotida iz nukleozida fosforamidita s nezaštićenom amino skupinom kao jedinice, i postupak prema Letsinger et al., koji je prikazan u sljedećoj shemi reakcije, poznat je kao prvi takav postupak (Nucleic Acids Research, 20:1879-1882, 1992):



Međutim, postupak prema Letsinger et al. nije praktičan, nije univerzalan i ne koristi se u praksi zbog sljedećih nedostataka:

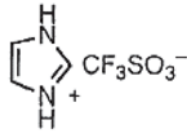
(1) iskorištenje reakcije kondenzacije je u svakom

stupnju nisko (oko 97%: za sintezu 50-članog oligonukleotida ili oligonukleotida duljeg lanca traži se iskorištenje od najmanje 99%) i za taj postupak se ne može upotrijebiti komercijalni automatski sintetizator DNA, tako da se ne može sintetizirati oligonukleotid dugog lanca koji se sastoji od 50 do 100 nukleotida, a koji su općenito potrebni u kemijskoj sintezi DNA, itd.; (2) mogu se upotrijebiti samo specifični nukleozid fosforamiditi visoke reaktivnosti, i stoga, taj postupak ima ograničeno područje primjene i nije praktičan; i (3) piridin hidroklorid, upotrijebljen kao akcelerator, je nestabilan spoj s vrlo visokom upojnošću vlage, i stoga je s njim teško rukovati.

Kratki opis izuma

Predloženi izum načinjen je s obzirom na gore opisano prethodno stanje tehnike, i cilj predmetnog izuma je osigurati praktičan postupak prikladan za laku i pouzdanu kemijsku sintezu 100-članog oligonukleotida ili oligonukleotida duljeg lanca, kao također i novog spoja upotrijebljenog u spomenutom postupku.

Za rješenje problema, predmetni izum osigurava postupak za kemijsku sintezu oligonukleotida i to postupkom s fosforamiditom, koji obuhvaća pripravu nukleozida fosforamidita nezaštićenog baznog dijela iz nukleozida nezaštićenog baznog dijela upotrebom imidazol trifluormetansulfonata, kojeg prikazuje sljedeća kemijska formula, i povezivanje spomenutog nukleotidnog fosforamidita nezaštićenog baznog dijela po prethodno određenom redoslijedu u prisutnosti spomenutog imidazol trifluormetansulfonata za kemijsku sintezu oligonukleotida koji se sastoji od specifične nukleotidne sekvence.



U izvedbi postupka ovog izuma, kojoj se daje prednost, povezani, nukleozidni fosforamidit nezaštićenog baznog dijela se obradi s otopinom benzimidazol triflurmetansulfonata.

To jest, izumitelji predmetnog izuma su pronašli, da nukleozidni fosforamidit nezaštićenog baznog dijela, proizveden upotrebom spoja imidazol trifluormetansulfonata (koji se ovdje kasnije spominje kao imidazolij triflat) umjesto tetrazola, koji se uobičajeno koristi kao sredstvo za ubrzavanje reakcije kondenzacije između nukleozidnog fosforamidita i nukleotida, ne uzrokuje sporednu reakciju na amino skupini u njegovoj nukleotidnoj baznoj skupini, i kao posljedicu, pronašli su da nisu potrebni složeni postupci kao što je, na primjer, uvođenje i odstranjivanje zaštitne skupine i također, da se njegovu sintezu može provesti s komercijalnim sintetizatorom, dopunjujući time ovaj izum. Nadalje, izumitelji predmetnog izuma pronašli su, da se sporednu reakciju na amino skupini u baznom dijelu može potpuno spriječiti obradom gore opisanog povezanog, nukleozidnog fosforamidita nezaštićene bazne skupine s metanolnom otopinom benzimidazol trifluormetansulfonata (koji se ovdje kasnije spominje kao benzimidazolij triflat), čime se sintetizira savršeniji oligonukleotid, i predmetni je izum time nadopunjen.

Kratki opis slika

Slika 1 prikazuje shematski svaki stupanj reakcije prema postupku ovog izuma.

Slika 2 prikazuje shematski svaki stupanj reakcije prema postupku predloženog izuma, gdje je provedena

Slika 3 prikazuje HPLC profil DNA fragmenata sintetiziranih postupkom prema ovom izumu.

Detaljan opis izuma

U nastavku je detaljno opisan najbolji način provedbe predloženog izuma.

Imidazolij triflat predloženog izuma može se proizvesti miješanjem imidazola s trifluormetansulfonskom kiselinom u omjeru od 1:1 ekvivalenta u diklormetanu, kako je dolje prikazano u primjeru 1 njegove pripreve.

Tako dobiven imidazolij triflat ne absorbira vlagu, što se također vidi u primjeru 1, i on je izvanredno postojan pod uobičajenim uvjetima upotrebe, tako da se s njim može lako rukovati.

U postupku kemijske sinteze prema ovom izumu, nukleozid fosforamidit nezaštićenog baznog dijela proizveden je iz nukleotida nezaštićenog baznog dijela upotrebom imidazolij triflata, kako je gore opisano, i taj nukleozidni fosforamidit nezaštićenog baznog dijela upotrijebljen je kao jedinica i svaki nukleozidni fosforamidit je povezan po prethodno određenom redoslijedu, čime je kemijski sintetiziran oligonukleotid koji se sastoji od specifične nukleotidne sekvence.

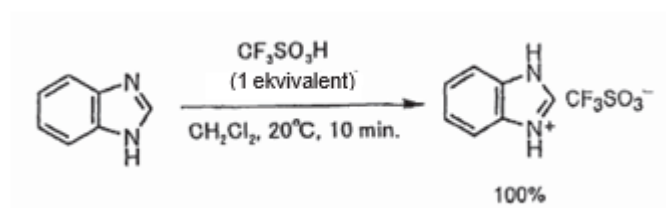
Nukleozidni fosforamidit nezaštićenog baznog dijela može se proizvesti reakcijom nukleozidnog fosforamidita nezaštićenog baznog dijela sa cijanoetil-bis-amiditom u prisutnosti imidazolij triflata kao katalizatora, kako je prikazano, npr. (dolje) u primjeru 2. U tom slučaju, reakcija se odvija selektivno na hidroksidnoj skupini u šećeru nukleozida, tako

da se mogu kvantitativno dobiti četiri vrste N-nezaštićenih nukleozid fosforamidita upotrijebljenih za DNA sintezu, to jest deoksiadenozin fosforamidit, deoksitimidin fosforamidit, deoksigvanozin fosforamidit i timidin fosforamidit.

Tako dobivene četiri vrste N-nezaštićenih nukleozid fosforamidita upotrijebljene su kao jedinice za sintezu oligonukleotida koji se sastoji od željene nukleotidne sekvence postupkom sinteze na krutoj fazi, koji je poznat u struci. Osim toga, ta reakcija sinteze može se također provesti u komercijalnom sintetizatoru DNA postupkom u skladu s njegovim protokolom.

Prema postupku ovog izuma, svaki povezani N-nezaštićeni nukleozid fosforamidit se nakon svakog povezivanja najprije podvrgava obradi s otopinom (npr. etanolna otopina) benzimidazolij triflata. Tom obradom se potpuno spriječava sporednu reakciju na amino skupini baznog dijela, i tako se, dakle, sintetizira puno bolji oligonukleotid.

Benzimidazolij triflat se može sintetizirati prema sljedećoj reakcijskoj shemi:

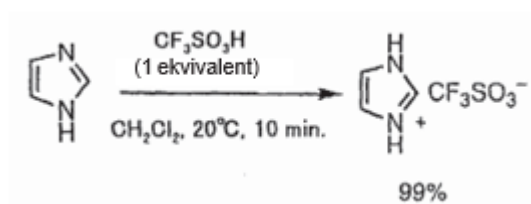


Primjeri

Predloženi izum će se u nastavku opisati s više pojedinosti i specifično s pozivom na primjere koji, međutim, nisu predviđeni kao ograničenje predmetnog izuma.

Primjer 1: Priprava imidazolij triflata

Imidazol i trifluormetansulfonska kiselina se pomiješaju u omjeru 1:1 ekvivalenta u diklormetanu i reagiraju 10 minuta pri 25°C, kako je prikazano u niže navedenoj shemi reakcije, čime se dobije imidazolij triflat ovog izuma.



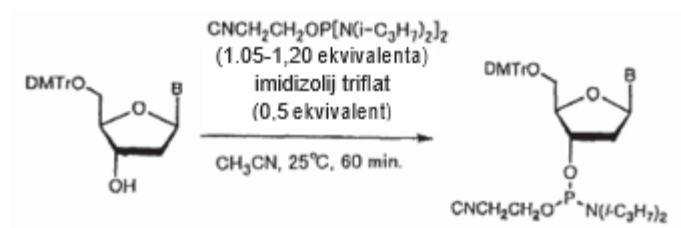
Kao rezultat analize, imidazolij triflat dobiven konvencionalnim postupcima imao je karakteristike prikazane u tablici 1.

Tablica 1

Bezbojan kristal
Talište: 197-198°C
Elementarna analiza:
Teorijski za: C ₄ H ₅ F ₃ N ₂ O ₃ S: C, 22.02; H, 2.31; N, 12.84
Nađeno: C, 21.96; H, 2.30; N, 12.74
Ne absorbira vlagu.

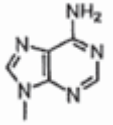
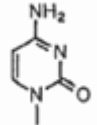
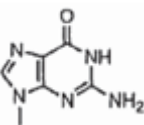
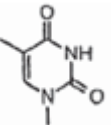
Primjer 2: Priprava nukleozidnog fosforamidita s nezaštićenim baznim dijelom

Imidazolij triflat dobiven u primjeru 1 upotrijebljen je kao katalizator tako da je nukleozid nezaštićenog baznog dijela reagirao sa cijanoetil-bis-amiditom, kako je prikazano u sljedećoj reakcijskoj shemi:



Ovom reakcijom proizvedene su četiri vrste N-nezaštićenih nukleozida fosforamidita koji su prikazani u tablici 2, to jest deoksiadenozin, deoksitimidin, deoksigvanozin i timidin fosforamidit. Kako je također prikazano u tablici 2, dotični nukleozidni fosforamiditi su dobiveni s gotovo kvantitativnim iskorištenjem.

Tablica 2

B:				
Iskorištenje, %:	96	98	97	99
Čistoća, %:	>98	>98	>96	>99
³¹ P NMR, ppm:	149.0, 149,1	149.2, 149.3	149.1, 149.2	149.0, 149.1

Primjer 3: Sinteza fragmenta DNA

Iz 4 vrste N-nezaštićenih nukleozida fosforamidita kao jedinica dobivenih u primjeru 2, postupkom sinteze na krutoj fazi i upotrebom komercijalnog DNA sintetizatora, sintetiziran je 60-člani DNA fragment koji se sastoji od nukleotidne sekvence SEQ ID NO:1. Ciklus reakcija prikazan je u tablici 3

Tablica 3

Stupanj	Operacija	Reagenti	Vrijeme, min
1	ispiranje	CH ₃ CN	0,50
2	ditritilacija	3% CCl ₃ COOH/CH ₂ CH ₂	1,0 X 3
3	ispiranje	CH ₃ CN	2,0
4	povezivanje	0,1 M amidit/CH ₃ CN +0,1 M IMT/ CH ₃ CN	0,25
5	čekanje		1,0
6	N-P odcjepljenje	0,3 M BIT/CH ₃ CN	0,50
7	čekanje		2,0
8	ispiranje	CH ₃ CN	0,50
9	oksidacija	1 M t-C ₄ H ₉ OOH/CH ₂ Cl ₂	0,25
10	čekanje		1,0

BIT = bezimidazolij triflat; IMT = imidazolij triflat

U ovoj reakciji sinteze, svaki stupanj (reakcija kondenzacije) u produživanju lanca, prikazan u tablici 1, odvija se s gotovo 100%-tnim iskorištenjem, i 60-člani oligonukleotid sa zaštićenom fosfatnom skupinom dobije se obično u 100%-tnom iskorištenju. To iskorištenje je izvanredno visoko ako se ima u vidu da iskorištenje na 60-članom oligonukleotidu u općenito vođenim konvencionalnim postupcima iznosi približno 20 do 40%.

Nadalje, kako je prikazano na slici 2, provedena je deprotekcija i odstranjivanje obradom s otopinom amonijaka (25°C, 60 minuta), pri čemu je dobivena nezaštićena 60-člana DNA s kvantitativnim iskorištenjem.

Analiza dobivene sirove nezaštićene 60-člane DNA pomoću visokodjelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC), pod uvjetima prikazanim u tablici 4, pokazuje da je njezina čistoća bila 95% ili viša, kako je prikazano na slici 3.

Tablica 4

Analitički uvjeti	
Stupac	DEAE 2,5 μ (250 mm)
Brzina protoka	0,5 ml/min
Temperatura	25°C
Sredstvo za ispiranje:	
A	20 ml/min Tris.HCl (pH 9,0)
B	A + 1 M NaCl
Gradijent	A:B (100:0) \rightarrow (50:50) linearan gradijent:

Kako je gore detaljno opisano, postupak sinteze oligonukleotida upotrebom ovog imidazolij triflata ima sljedeće prednosti:

- (1) iskorištenje kondenzacije u svakom stupnju je skoro 100%, i predmetni postupak može se također primijeniti u automatskom sintetizatoru samo promjenom programa za sintezu i upotrijebljenih reagenata, tako da je sinteza oligonukleotida dugačkog lanca, koji se sastoji od 50 do 100 nukleotida, koja je općenito potrebna u kemijskoj sintezi DNA itd., moguća s troškovima od 1/10 ili manjim u usporedbi sa sintezom konvencionalnim postupcima;
- (2) budući da se mogu upotrijebiti nespecificirani nukleotidni fosforamiditi, predmetni postupak ima široko područje primjene i on je praktičan; i
- (3) imidazolij triflat ovog izuma, upotrijebljen kao akcelerator, je stabilan spoj koji ne absorbira vlagu, tako da je rukovanje s njim pod uobičajenim uvjetima upotrebe vrlo lako.

ISPIS SEKVENCI

BROJ SEKVENCE: 1

DULJINA: 60 baza

VRSTA: nukleinska kiselina

BROJ LANACA: jednostruka

TOPOLOGIJA: linearna

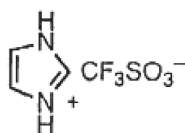
VRSTA MOLEKULE: sintetička DNA

SEKVENCA:

TATGGGCCTT TTGATAGGAT GCTCACCGAG CAAAACCAAG AACAACCAGG AGATTTTATT 60

PATENTNI ZAHTJEVI

1. Postupak za kemijsku sintezu oligonukleotida s fosforamiditom, **naznačen time**, da on obuhvaća pripravu nukleozidnog fosforamidita s nezaštićenim baznim dijelom iz nukleozida nezaštićenog baznog dijela upotrebom imidazol trifluormetansulfonata, prikazanog sa sljedećom kemijskom formulom, i povezivanje spomenutog nukleotidnog fosforamidita nezaštićenog baznog dijela po prethodno određenom redoslijedu u prisutnosti imidazol trifluormetansulfonata, za kemijsku sintezu oligonukleotida koji se sastoji od specifične nukleotidne sekvence.

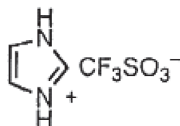


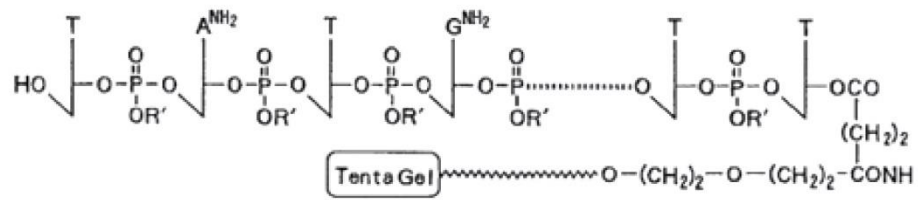
2. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, da se nukleozidni fosforamidit nezaštićenog baznog dijela obradi s otopinom benzimidazol trifluormetansulfonata.

SAŽETAK

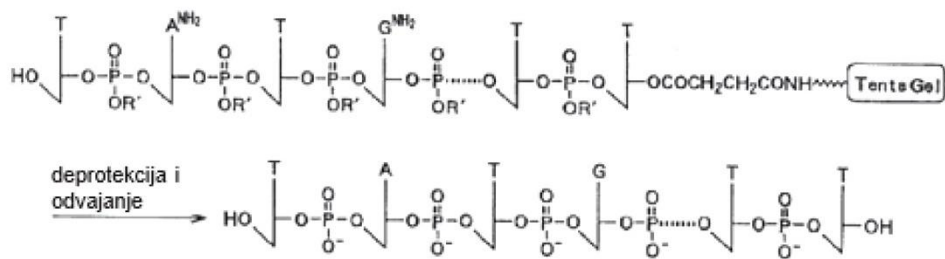
Postupak za kemijsku sintezu oligonukleotida

Predloženi izum osigurava praktičan postupak prikladan za laku i pouzdanu kemijsku sintezu 100-članog ili duljeg oligonukleotida dugog lanca i novi spoj upotrijebljen u spomenutom postupkom. Predloženi izum odnosi se na postupak za kemijsku sintezu oligonukleotida postupkom s fosforamiditom, koji obuhvaća pripravu nukleozid fosforamidita nezaštićenog baznog dijela iz nukleozida nezaštićenog baznog dijela upotrebom imidazol trifluormetan sulfonata, kojeg prikazuje sljedeća kemijska formula, i povezivanje spomenutog nukleotid fosforamidita nezaštićenog baznog dijela po prethodno određenom redoslijedu za kemijsku sintezu oligonukleotida koji se sastoji od specifične nukleotidne sekvence, kao također i na imidazol trifluormetansulfonat prikazan s kemijskom formulom.

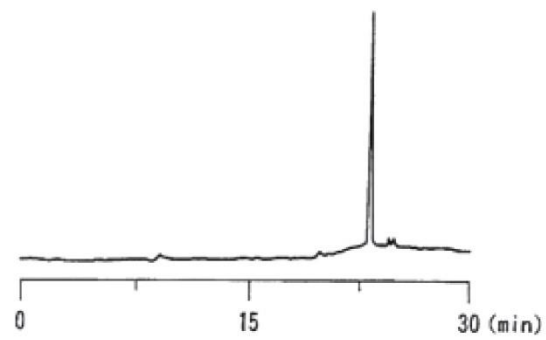




Slika 1



Slika 2



Slika 3