



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 235 372**

⑤① Int. Cl.7: **C07H 21/00**
C07H 21/02
C07H 21/04
C07C 321/00
C07C 323/00
C07C 381/00

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **98953408 .6**
⑧⑥ Fecha de presentación: **13.10.1998**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1023310**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2000**

⑤④ Título: **Método para sintetizar oligonucleótidos sulfurados.**

③⑩ Prioridad: **15.10.1997 US 950779**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2005

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2005

⑦③ Titular/es: **ISIS PHARMACEUTICALS, Inc.**
2292 Faraday Avenue
Carlsbad, California 92008, US

⑦② Inventor/es: **Cole, Douglas, L.;**
Ravikumar, Vasulinga, T. y
Cheruvallath, Zacharia, S.

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 235 372 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para sintetizar oligonucleótidos sulfurados.

5 Campo de la invención

La presente invención se dirige a métodos para sintetizar oligonucleótidos sulfurados y análogos de los mismos. Los métodos emplean un reactivo de disulfuro de fenilacetilo en un sistema solvente simplificado y producen oligonucleótidos que tienen grupos fosforotioato con gran eficiencia y mejores rendimientos.

10 Antecedentes de la invención

Los oligonucleótidos modificados son de gran valor en la investigación biológica molecular y en aplicaciones tales como la terapia antivírica. Los oligonucleótidos modificados que pueden bloquear la traducción de ARN y que son resistentes a las nucleasas son útiles como reactivos antisentido. Los oligonucleótidos sulfurados, que contienen uniones fosforotioato (P-S), tienen interés en estas áreas. Los oligonucleótidos que contienen fosforotioato son también útiles en la determinación de las rutas estereoquímicas de ciertas enzimas que reconocen ácidos nucleicos.

Se han aplicado técnicas estándar para la sulfurización de compuestos que contienen fósforo a la síntesis de oligonucleótidos sulfurados. Como ejemplos de reactivos sulfurizantes que han sido utilizados para sintetizar oligonucleótidos que contiene enlaces fosforotioato, se incluyen azufre elemental, tetrasulfuro de dibenzoilo, 1,1-dióxido de 3-H-1,2-benziditiol-3-ona (también conocido como reactivo de Beaucage), disulfuro de tetraetiltiouramilo ("TETD") y disulfuro de *bis*(O,O-diisopropoxifosfinotioilo) (conocido como reactivo de Stec). La mayoría de los reactivos sulfurizantes, sin embargo, presentan uno o más inconvenientes significativos.

El azufre elemental presenta problemas y no es adecuado para automatización debido a su insolubilidad en la mayoría de los solventes orgánicos. Más aún, el disulfuro de carbono, una fuente preferida de azufre, tiene una volatilidad indeseable y un punto de inflamación indeseablemente bajo. Con frecuencia, se observan productos colaterales indeseados con el uso del tetrasulfuro de dibenzoilo. El reactivo de Beaucage, aun siendo un reactivo de sulfurización relativamente eficiente, es difícil de sintetizar y no es particularmente estable. Más aún, el reactivo de Beaucage forma un producto de reacción secundario que es un potente agente oxidante. (R.P. Iyer y col., *J. Am. Chem. Soc.* 112, pp. 1253-1254 (1990); R.P. Iyer y col., *J. Org. Chem.* 55, 4693-4699 (1990)). Éste puede además dar lugar a productos colaterales no deseados que pueden ser difíciles de separar del producto de reacción deseado. El disulfuro de tetraetiltiouramilo, aun siendo relativamente barato y estable, tiene una velocidad de reacción de sulfurización que puede ser indeseablemente lenta.

Se describe un método para producir un éster de fosforotioato por reacción de un éster de fosfito con un disulfuro de acilo en la solicitud de patente Holandesa N° 8902521. El método descrito es aplicado a un dímero de fosfotriéster purificado utilizando química de fase de solución. El método es intensivo en cuanto a tiempo y en cuanto a trabajo, en el sentido de que sólo mostró funcionar en un esquema complejo que conllevaba realizar la primera etapa de síntesis (formación de un fosfito) en acetonitrilo, eliminar el acetonitrilo, purificar el fosfotriéster intermedio y proceder con la sulfurización en una mezcla de solventes de dicloroetano (DCE) y 2,4,6-colidina. Más aún, el método fue sólo demostrado con un nucleótido. No se hizo sugerencia alguna de que el método Holandés pudiera ser empleado con estructuras de ácido nucleico mayores, de que el mismo pudiera emplear un solvente común a través de todas las etapas de síntesis, de que se pudieran obtener mejores resultados o de que el método pudiera ser adaptado para la síntesis automatizada convencional sin grandes modificaciones del esquema de automatización. Aunque se cita el acetonitrilo como uno de los diversos solventes posibles, no se demostró la utilidad del método para llevar a cabo todas las etapas de la síntesis en acetonitrilo como solvente común. Aunque otras publicaciones (Kamer y col., *Tetrahedron Letters* 30(48), pp. 6757-6760 (1989); Roelen y col., *Rech. Trav. Chim. Pays-Bas* 110, pp. 325-331 (1991)) muestran la sulfurización de oligómeros que tienen hasta 6 nucleótidos, los inconvenientes anteriores no son resueltos por los métodos descritos en estas referencias.

Por lo tanto, sigue habiendo necesidad de métodos y reactivos mejorados para preparar grupos fosforosos que contienen azufre, tales como uniones fosforotioato, en oligonucleótidos y otros compuestos orgánicos. La presente invención se dirige a estos, así como a otros, fines importantes.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona métodos para la síntesis de oligonucleótidos de fosforotioato con mejores rendimientos en comparación con los obtenidos con los métodos anteriores. Más aún, los presentes métodos son útiles para la síntesis no sólo de oligonucleótidos de fosforotioato que tienen números relativamente grandes de unidades nucleotídicas/nucleosídicas en los mismos, por ejemplo de aproximadamente 6 a aproximadamente 50 y, lo que es más, particularmente de aproximadamente 8 a aproximadamente 30 unidades nucleotídicas/nucleosídicas. Los métodos de la presente invención emplean un sistema solvente muy simplificado, uno que es compatible con esquemas de reacción sintéticos automatizados y sintetizadores comerciales. El perfeccionamiento resultante en las oportunidades sintéticas permite una amplia aplicación de los presentes métodos en toda la química de los ácidos nucleicos.

ES 2 235 372 T3

Un aspecto de la presente invención describe un método para la preparación de oligonucleótidos de fosforotioato, cuyo método consiste en:

5 fosfitilar el 5'-hidroxilo de un resto de ácido nucleico en acetonitrilo para formar un intermediario fosfito, estando unido dicho resto de ácido nucleico a un soporte sólido, y

10 oxidar dicho intermediario fosfito con un disulfuro de acetilo en un sistema solvente consistente en acetonitrilo y piridina, piridina estéricamente bloqueada o una mezcla de éstos, durante un tiempo suficiente para efectuar la conversión de dicho intermediario fosfito a dicho fosforotioato. Se pueden preparar oligonucleótidos de fosforotioato que tienen una longitud y una secuencia predeterminadas repitiendo las etapas de fosfitilación y oxidación.

15 En otros aspectos de la presente invención, se describen métodos para la síntesis de análogos de oligonucleótidos de fosforotioato, consistentes en la sustitución con nucleótidos, nucleósidos, oligonucleótidos y oligonucleósidos modificados de nucleótidos, nucleósidos, oligonucleótidos u oligonucleósidos. Las modificaciones de nucleótidos, nucleósidos, oligonucleótidos y oligonucleósidos son bien conocidas en la técnica. Tal como se usa aquí, el término "oligonucleótido de fosforotioato" pretende incluir análogos según se ha definido anteriormente.

20 El término "resto de fosfito", tal como se usa aquí, pretende incluir restos de fosfito en nucleósidos, nucleótidos, oligonucleósidos y oligonucleótidos. En una realización preferida, los restos de fosfito están en un estado activado, tal como una dimetoxitrietilfosforamida. Los términos "nucleótido, nucleósido, oligonucleótido u oligonucleósido", tal como se utilizan aquí, pretenden incluir tanto especies naturales como especies no naturales o modificadas, como es sabido para los expertos en la técnica. Las modificaciones comunes incluyen modificaciones de los azúcares, tales como modificaciones 2', y modificaciones de las bases o el uso de bases substitutas. Cuando se usa un oligonucleótido o un oligonucleótido modificado como resto de fosfito, también pueden estar presentes uniones modificadas, como es
25 comúnmente sabido en la técnica.

30 Los presentes métodos tienen niveles inferiores demostrados de impurezas y mayores rendimientos en comparación con cuando se usa DCE como solvente para la etapa de oxidación. Los presentes métodos han mostrado también, de forma inesperada, que se pueden obtener rendimientos de aproximadamente el 99% en acetonitrilo/picolina. El acetonitrilo/picolina es totalmente compatible con la síntesis automatizada sin gran modificación de la rutina sintética, de tal forma que los presentes métodos pueden ser ventajosamente usados en un sintetizador automatizado. Por ejemplo, no se requieren grandes lavados, ya que se usa un solo solvente o mezcla que tiene un solvente común en todas las etapas sintéticas automatizadas. De este modo, se pueden eliminar las etapas de eliminación del solvente y de lavado. También se ha descubierto, sorprendentemente, que se pueden alcanzar altos rendimientos cuando se sintetizan oligonucleótidos o análogos de oligonucleótidos de fosforotioato que tienen de aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos.

40 Como sistemas solventes adecuados para uso en la oxidación del intermediario fosfito de la presente invención, se incluyen mezclas de dos o más solventes. Preferiblemente, una mezcla de un solvente aprótico con un solvente prótico o básico. Como mezclas solventes preferidas, se incluyen acetonitrilo/picolina y acetonitrilo/lutidina. Como solventes apróticos adecuados, se incluyen piridina y piridinas bloqueadas, tales como lutidina, colidina y picolina. Las mezclas solventes pueden incluir, por ejemplo, dos solventes tales como acetonitrilo y picolina o acetonitrilo y lutidina en una razón de volúmenes de aproximadamente 1:1,5 a aproximadamente 1,5:1, preferiblemente de aproximadamente 1:1.

45 La sulfurización (oxidación utilizando un reactivo sulfurizante) según los métodos de la presente invención es llevada a cabo por contacto de un oligonucleótido o análogo con un disulfuro de acetilo durante un tiempo suficiente para efectuar la formación de un grupo funcional fosforotioato. Como reactivos preferidos, se incluyen disulfuro de fenilacetilo, disulfuro de arilacetilo y disulfuros de fenilacetilo aril-substituidos.

50 Se puede hacer el contacto del resto de fosfito con disulfuro de acetilo usando procedimientos y equipos conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede emplear adecuadamente un reactor de vidrio, tal como un matraz. Preferiblemente, se emplean procedimientos de síntesis en fase sólida y un soporte sólido tal como vidrio de poro controlado. Incluso más preferiblemente, los métodos de la presente invención pueden ser llevados a cabo usando sintetizadores de ADN automatizados. Se describen técnicas adecuadas de fase sólida, incluyendo técnicas de síntesis automatizada, en F. Eckstein (ed.), *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, Oxford University Press, New York (1991).

60 Los métodos de la presente invención pueden ser adecuadamente llevados a cabo a temperatura ambiente. "Temperatura ambiente" incluye temperaturas ambiente de desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 30°C. Los tiempos de reacción son del orden de minutos, tal como, por ejemplo, 2, 3, 4 ó 5 minutos, o incluso de tan sólo aproximadamente 100 segundos.

65 En general, los métodos de la presente invención incluyen la fosfitilación del grupo 5'-hidroxilo de un resto de ácido nucleico para formar un intermediario fosfito y la oxidación del intermediario fosfito con un disulfuro de acetilo durante un tiempo suficiente para efectuar la conversión del intermediario fosfito en un fosforotioato. El intermediario fosfito puede ser, por ejemplo, un dinucleótido unido a fosfito, o un oligonucleótido u oligonucleósido que tenga al menos una unión fosfito en el mismo. Las etapas de fosfitilación y de oxidación del método son ambas realizadas en un sistema que incluye acetonitrilo. La repetición de las etapas de fosfitilación y oxidación dará el oligonucleótido de

ES 2 235 372 T3

fosforotioato con una longitud predeterminada. El progreso de la reacción puede ser monitorizado por técnicas bien conocidas, tales como la RMN de protones o de ^{31}P . El producto de reacción puede ser tratado con una base, tal como, por ejemplo, una solución de hidróxido de amonio a una concentración de aproximadamente el 30 por ciento. Se puede aislar fácilmente el producto deseado, por ejemplo, por técnicas de filtración estándar.

5

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos de la presente invención y no deberían ser considerados como limitantes del alcance de la invención en modo alguno. Estos ejemplos y sus equivalentes serán más evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción y de las reivindicaciones adjuntas.

10 Ejemplo 1

Síntesis de heptámero de 5'-TTTTTT'-3'-fosforotioato

Se recogen 50 miligramos (2 μmoles) de 5'-O-dimetoxitritilimidina unida a "CPG" (vidrio de poro controlado) a través de una unión éster en un reactor de vidrio y se añade una solución en diclorometano de ácido dicloroacético al 2% (volumen/volumen) para desproteger el grupo 5'-hidroxilo. Se lava el producto con acetonitrilo. Se añaden entonces una solución 0,2 M de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)imidina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-di-isopropilfosforamidita) en acetonitrilo y una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se lava el producto con acetonitrilo y se añade luego una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se repite esta etapa de sulfurización una vez más durante 3 minutos. Se lava el soporte con acetonitrilo y se añade luego una solución de anhídrido acético/lutidina/THF (1:1:8) y N-metilimidazol/THF para rematar cualquier grupo 5'-hidroxilo no reaccionado. Se lava el producto con acetonitrilo.

Se repite este ciclo completo cinco veces más para producir el heptámero de timidina completamente protegido. Se trata el vehículo que contiene el compuesto con una solución acuosa al 30% de hidróxido de amonio durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se filtra la solución acuosa y se concentra a presión reducida, para obtener un heptámero de fosforotioato, TTTTTTT.

30 Ejemplo 2

Síntesis de tetrámero de 5'-d(GACT)-3'-fosforotioato

Se recogen 50 miligramos (2×10^{-6} moles (2 μmoles)) de 5'-O-dimetoxitritilimidina unida a CPG (vidrio de poro controlado) a través de una unión éster en un reactor de vidrio y se añade una solución en diclorometano de ácido dicloroacético al 2% (volumen/volumen) para desproteger el grupo 5'-hidroxilo. Se lava el producto con acetonitrilo. Se añaden entonces una solución 0,2 M de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)imidina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita) en acetonitrilo y una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se lava el producto con acetonitrilo y se añade luego una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se repite esta etapa de sulfurización una vez más durante 3 minutos. Se lava el soporte con acetonitrilo y se añade luego una solución de anhídrido acético/lutidina/THF (1:1:8) y N-metilimidazol/THF para rematar el grupo 5'-hidroxilo no reaccionado. Se lava el producto con acetonitrilo.

Se añade una solución de ácido dicloroacético al 2% (volumen/volumen) para desproteger el grupo 5'-hidroxilo. Se lava el producto con acetonitrilo. Se añaden entonces una solución 0,2 M de N⁶-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxicidina-3'-O-(2-cianoetil-N,N'-diisopropilfosforamidita) en acetonitrilo y una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se lava el producto con acetonitrilo y se añade entonces una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se repite esta etapa de sulfurización una vez más durante 3 minutos. Se lava el soporte con acetonitrilo y se añade luego una solución de anhídrido acético/lutidina/THF (1:1:8) y N-metilimidazol/THF para rematar cualquier grupo 5'-hidroxilo no reaccionado. Se lava el producto con acetonitrilo.

Se añade una solución de ácido dicloroacético al 2% (volumen/volumen) para desproteger el grupo 5'-hidroxilo. Se lava el producto con acetonitrilo. Se añaden entonces una solución 0,2 M de N⁶-benzoil-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxiadenosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N'-diisopropilfosforamidita) en acetonitrilo anhidro y una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se lava el producto con acetonitrilo y se añade entonces una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se repite esta etapa de sulfurización una vez más durante 3 minutos. Se lava el soporte con acetonitrilo y se añade luego una solución de anhídrido acético/lutidina/THF (1:1:8) y N-metilimidazol/THF para rematar cualquier grupo 5'-hidroxilo no reaccionado. Se lava el producto con acetonitrilo.

Se añade una solución de ácido dicloroacético al 2% (volumen/volumen) para desproteger el grupo 5'-hidroxilo. Se lava el producto con acetonitrilo. Se añaden entonces una solución 0,2 M de N²-isobutiril-5'-O-4,4'-dimetoxitritil-desoxiguanosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N'-diisopropilfosforamidita) en acetonitrilo y una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se lava el producto con acetonitrilo y se añade entonces una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se repite esta etapa de sulfurización una vez más durante 3

ES 2 235 372 T3

minutos. Se lava el soporte con acetonitrilo y se añade luego una solución de anhídrido acético/lutidina/THF (1:1:8) y N-metilimidazol/THF para rematar cualquier grupo 5'-hidroxilo no reaccionado. Se lava el producto con acetonitrilo.

5 Se trata el vehículo que contiene el compuesto con una solución acuosa de hidróxido de amonio al 30% durante 90 minutos a temperatura ambiente y se incuba después a 55°C durante 24 horas. Se filtra la solución acuosa y se concentra a presión reducida, para obtener un tetrámero de fosforotioato de 5'-dG-dA-dC-T-3'.

Ejemplo 3

10 *Síntesis de un 20-mero de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT)-3'-fosforotioato totalmente modificado*

Se realizó la síntesis de la secuencia anterior en un sintetizador OligoPilot II de Pharmacia a una escala de 620 μ moles usando las cianoetilfosforamiditas y el soporte cebador de Pharmacia. Se realizó la sulfurización usando una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, se lavó el soporte con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió y se purificó como se ha ilustrado previamente.

Ejemplo 4

20 *Síntesis de un 20-mero de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3'-fosforotioato totalmente modificado*

Se realizó la síntesis de la secuencia anterior en un sintetizador OligoPilot II de Pharmacia a una escala de 620 μ moles usando las cianoetilfosforamiditas y el soporte cebador de Pharmacia. Se realizó la sulfurización usando una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, se lavó el soporte con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió y se purificó como se ha ilustrado previamente.

Ejemplo 5

Síntesis de un 21-mero de 5'-d(GCG-TTT-GCT-CTT-CTT-GCG)-3'-fosforotioato totalmente modificado

30 Se realizó la síntesis de la secuencia anterior en un sintetizador OligoPilot II de Pharmacia a una escala de 620 μ moles usando las cianoetilfosforamiditas y el soporte cebador de Pharmacia. Se realizó la sulfurización usando una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, se lavó el soporte con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió y se purificó como se ha ilustrado previamente.

Ejemplo 6

Síntesis de un 20-mero de 5'-d(GTT-CTC-GCT-GGT-GAG-TTT-CA)-3'-fosforotioato totalmente modificado

40 Se realizó la síntesis de la secuencia anterior en un sintetizador OligoPilot II de Pharmacia a una escala de 620 μ moles usando las cianoetilfosforamiditas y el soporte cebador de Pharmacia. Se realizó la sulfurización usando una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 2 minutos. Al final de la síntesis, se lavó el soporte con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió y se purificó como se ha ilustrado previamente.

Ejemplo 7

45 *Síntesis de un 20-mero de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA)-2'-meto-xietil(CAU-GCA-UU)-3'-fosforotioato totalmente modificado*

50 Se realizó la síntesis de la secuencia anterior en un sintetizador Milligen 8800 a una escala de 282 μ moles usando las cianoetilfosforamiditas y el soporte cebador de Pharmacia. Se realizó la sulfurización usando una solución 0,4 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 6 minutos. Al final de la síntesis, se lavó el soporte con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió y se purificó como se ha ilustrado previamente.

Ejemplo 8

55 *Síntesis de un 20-mero de 5'-d(TCC-CGC-CTG-TGA)-2'-meto-xietil(CAU-GCA-UU)-3'-fosforotioato totalmente modificado*

60 Se realizó la síntesis de la secuencia anterior en un sintetizador OligoPilot II de Pharmacia a una escala de 250 μ moles usando las cianoetilfosforamiditas y el soporte cebador de Pharmacia. Se realizó la sulfurización usando una solución 0,4 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 10 minutos. Al final de la síntesis, se lavó el soporte con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió y se purificó como se ha ilustrado previamente.

65

ES 2 235 372 T3

Ejemplo 9

Síntesis de un 21-mero de 5'-[2'-metoxietil(GCGUUUG)-d[CTCTTCT]-[2'-metoxietil(UCUUGC)-dG-3'-fosforotioato totalmente modificado

5

Se realizó la síntesis de la secuencia anterior en un sintetizador OligoPilot II de Pharmacia a una escala de 250 μ moles usando las cianoetilfosforamiditas y el soporte cebador de Pharmacia. Se realizó la sulfurización usando una solución 0,4 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 6 minutos. Al final de la síntesis, se lavó el soporte con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió y se purificó como se ha ilustrado previamente.

10

Ejemplo 10

Síntesis de un 20-mero de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC)-2'-meto-xietil(AUC-CGU-CA)-3'-fosforotioato totalmente modificado

15

Se realizó la síntesis de la secuencia anterior en un sintetizador Milligen 8800 a una escala de 565 μ moles usando las cianoetilfosforamiditas y el soporte cebador de Pharmacia. Se realizó la sulfurización usando una solución 0,4 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 6 minutos. Al final de la síntesis, se lavó el soporte con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió y se purificó como se ha ilustrado previamente.

20

Ejemplo 11

Síntesis de un 20-mero de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC)-2'-meto-xietil(AUC-CGU-CA)-3'-fosforotioato totalmente modificado

25

Se realizó la síntesis de la secuencia anterior en un sintetizador OligoPilot II de Pharmacia a una escala de 680 μ moles usando las cianoetilfosforamiditas y el soporte cebador de Pharmacia. Se realizó la sulfurización usando una solución 0,4 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1 v/v) durante 6 minutos. Al final de la síntesis, se lavó el soporte con acetonitrilo, se escindió, se desprotegió y se purificó como se ha ilustrado previamente.

30

Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden hacer numerosos cambios y modificaciones en las realizaciones preferidas de la invención y que se pueden realizar dichos cambios y modificaciones sin desviarse del espíritu de la invención. Se pretende, por lo tanto, que las reivindicaciones adjuntas cubran todas esas variaciones equivalentes en la medida en que queden dentro del verdadero espíritu y alcance de la invención.

35

Diversas modificaciones de la invención, además de las aquí descritas, serán evidentes para los expertos en la técnica gracias a la descripción que antecede. Dichas modificaciones pretenden quedar incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de oligonucleótidos de fosforotioato, cuyo método consiste en:

5 fosfitilar el 5'-hidroxilo de un resto de ácido nucleico en acetonitrilo para formar un intermediario fosfito, estando unido dicho resto de ácido nucleico a un soporte sólido, y

10 oxidar dicho intermediario fosfito con un disulfuro de acetilo en un sistema solvente consistente en acetonitrilo y piridina, piridina estéricamente bloqueada o una mezcla de éstos, durante un tiempo suficiente para efectuar la conversión de dicho intermediario fosfito a dicho fosforotioato.

2. El método de la reivindicación 1, donde dicha oxidación se hace en presencia de acetonitrilo:lutidina en una proporción de 1:1 en base al volumen.

15 3. El método de la reivindicación 1, donde dicha piridina estéricamente bloqueada es colidina, lutidina o picolina.

4. El método de la reivindicación 1, que incluye la repetición de dicha fosfitilación y dicha oxidación para obtener dicho oligonucleótido de fosforotioato con una longitud predeterminada.

20 5. El método de la reivindicación 1, donde dicho intermediario fosfito es un dinucleótido.

6. El método de la reivindicación 1, donde dicho intermediario fosfito es un oligonucleótido.

25 7. El método de la reivindicación 1, donde dicha fosfitilación es realizada usando un resto de fosfito.

8. El método de la reivindicación 7, donde dicho resto de fosfito es una fosforamidita.

9. El método de cualquier reivindicación precedente, donde dicho disulfuro de acetilo es un disulfuro de arilacetilo.

30 10. El método de la reivindicación 9, donde dicho disulfuro de arilacetilo es un disulfuro de fenil- acetilo aril-substituido.

11. El método de la reivindicación 9, donde dicho disulfuro de arilacetilo es disulfuro de fenilacetilo.

35

40

45

50

55

60

65