



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 296 372**

51 Int. Cl.:
C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99307066 .3**

86 Fecha de presentación : **06.09.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1028124**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2000**

54 Título: **Procedimiento de desprotección mejorado para la síntesis de compuestos oligoméricos.**

30 Prioridad: **04.02.1999 US 118564 P**
09.04.1999 US 288679

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es: **ISIS PHARMACEUTICALS, Inc.**
1896 Rutherford Road
Carlsbad, California 92008, US

72 Inventor/es: **Ravikumar, Vasulinga T.;**
Manoharan, Muthiah;
Capaldi, Daniel C.;
Krotz, Achim;
Cole, Douglas L. y
Guzaev, Andrei

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 296 372 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

Procedimiento de desprotección mejorado para la síntesis de compuestos oligoméricos.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a procedimientos mejorados para la preparación de compuestos oligómeros que tienen fosfodiéster, fósforotioato, fósforoditioato u otros enlaces. En realizaciones preferidas, los procedimientos de la invención proporcionan oligómeros que tienen cantidades reducidas de productos secundarios no deseados.

10

Antecedentes de la invención

Las terapias antisentido y otros oligonucleótidos han ido más allá de las publicaciones académicas hasta el nivel de fármaco aprobado tal como se muestra por la reciente aprobación por la FDA de una terapéutica con oligonucleótido antisentido para infecciones oculares por citomegalovirus. Más y más oligonucleótidos están introduciéndose en clínica para el tratamiento de una diversidad de enfermedades tales como inflamación, cáncer, enfermedad viral y otras. Existe una necesidad urgente de procedimientos mejorados para la síntesis de oligonucleótidos en alta cantidad y con alta calidad. La química en fase sólida es el procedimiento presente elegido. Los sintones típicos actualmente usados son monómeros de nucleósido fosfoamidita O-cianoetil protegidos. Al final de la síntesis, el producto oligonucleótido se trata típicamente con hidróxido amónico acuoso al 30% para desproteger los grupos cianoetilo sobre la estructura principal fosforotioato así como grupos amino exocíclicos. Durante esta etapa de desprotección, se produce una molécula de acrilonitrilo por cada grupo cianoetilo presente.

Es sabido ahora que el acrilonitrilo es un carcinógeno para roedores y que, a pH 7, puede reaccionar con T, dC, dG, dA y dl, dando como resultado la formación de una diversidad de aductos. Véase, Solomon y otros, *Chem. - Biol. Interactions*, vol. 51, págs. 167-190, (1984). Es altamente deseable eliminar estas impurezas en la síntesis de oligonucleótidos, especialmente oligonucleótidos fosforotioato.

Eritja y otros, (*Tetrahedron*, vol. 48, págs. 4171-4182, (1992)) informan de la prevención de formación de aducto de acrilonitrilo de restos de nucleobase durante la desprotección de oligómeros β -cianoetil protegidos mediante trietilamina al 40% en piridina durante 3 horas seguido de tratamiento con DBU 0,5 M/piridina. Sin embargo, tal como se verá más adelante, sus condiciones fallaron en la eliminación de la formación de aducto hasta un grado adecuado.

La patente DE 196 27 898 A1 describe un procedimiento para la preparación de oligonucleótidos mediante síntesis en fase sólida, en el cual los grupos amino exocíclicos presente sobre las nucleobases están protegidos con grupos diacilo cíclicos. Los grupos amino exocíclicos pueden desprotegerse en la presencia de una base no nucleófila, fuerte.

La patente de EE.UU. 5.589.586 describe un procedimiento de síntesis de oligonucleótidos en la que el primer nucleósido está unido a un soporte a través de un enlace sililéter, lo cual permite que los oligonucleótidos sean más fácil y eficazmente sintetizados, desprotegidos y purificados.

La patente de EE.UU. 5.514.789 describe un procedimiento para la escisión y desprotección de unos oligonucleótidos recientemente sintetizados a partir de un soporte sólido, lo cual implica la incubación del soporte sólido en un ambiente que comprende un reactivo de escisión/desprotección gaseoso tal como amoníaco gaseoso o vapor de hidróxido amónico.

Boal y otros, *Nucleic Acids Research*, vol. 24, págs. 3115-3117, (1996) describen un procedimiento para la desprotección de oligodesoxirribonucleótidos en el que se usan aminos gaseosas bajo presión para lograr condiciones de desprotección suaves y rápidas.

La patente WO 97/29780 describe composiciones que comprenden oligonucleótidos que tienen una modificación metoxietoxi en la posición 2'. Los oligonucleótidos modificados pueden prepararse mediante técnicas de síntesis en fase sólida rutinarias.

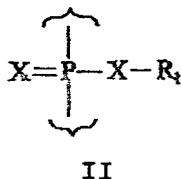
Dada la demanda de oligonucleótidos y análogos de los mismos para uso clínico, y la conocida toxicidad de aductos de nucleobase de acrilonitrilo, son altamente deseados procedimientos de preparación de oligómeros ligados a fosfato que tengan una cantidad reducida de dichos aductos. La presente invención está dirigida a ello, así como a otros fines importantes.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento mejorado para la preparación de oligómeros ligados a fosfato que tienen cantidades significativamente reducidas de aducto de nucleobase exocíclica resultante de los productos de eliminación de grupos de protección de fósforo. En un aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos para la

ES 2 296 372 T3

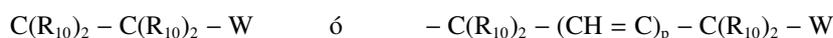
desprotección de un oligómero ligado a fosfato, teniendo dicho oligómero una pluralidad de enlaces fósforo protegidos de Fórmula II:



en la que:

cada X es O o S;

R_t es un grupo de protección de fósforo de la fórmula:



en la que cada R₁₀ es H;

W es un grupo captador de electrones;

p es 1 hasta 3;

que comprende:

(a) proporcionar una muestra que contiene una pluralidad de dichos oligómeros ligados a fosfato;

(b) la puesta en contacto de dichos oligómeros con un reactivo de desprotección durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para eliminar dichos grupos R_t de dichos oligómeros para formar una pluralidad de oligómeros desprotegidos; en el que dicho reactivo de desprotección comprende al menos una amina alifática, teniendo el ácido conjugado de dicha amina un pKa de desde 8 hasta 11; comprendiendo además dicho reactivo de desprotección uno o más disolventes seleccionados entre el grupo constituido por disolventes alquilo, disolventes haloalquilo, disolventes cianoalquilo, disolventes arilo y disolventes aralquilo, siempre y cuando dicho reactivo de desprotección no comprenda un disolvente de base heterocíclica además de dicha amina alifática; y

(c) la reacción de dichos oligómeros desprotegidos con un reactivo de escisión.

Preferiblemente, los procedimientos comprenden además una etapa de lavado antes de la etapa (c).

En algunas realizaciones preferidas, los oligómeros están en solución. En otras realizaciones preferidas, los oligómeros está ligados a un soporte sólido.

En algunas realizaciones preferidas, dicho reactivo de desprotección no escinde dichos oligómeros de dicho soporte sólido.

En algunas realizaciones preferidas, la amina alifática es trietilamina o piperidina.

En otras realizaciones preferidas, el agente de desprotección comprende un disolvente haloalquilo o un disolvente cianoalquilo, el cual es, preferiblemente, acetonitrilo o cloruro de metileno.

En realizaciones particularmente preferidas, el grupo de protección de fósforo es -CH₂-CH₂-C≡N o -(CH=CH)_p-CH₂-C≡N, en donde p es un número entero de desde 1 hasta 3, siendo preferidos -CH₂-CH₂-C≡N o -CH₂-CH=CH-CH₂-C≡N, y siendo particularmente preferido -CH₂-CH₂-C≡N.

En algunas realizaciones preferidas, el reactivo de desprotección o reactivo de escisión comprende además un purificador, el cual es un mercaptano, un beta amino tiol, una fosfina, un fosfito, un dieno, una urea, una tiourea, una amida, una imida, una imida cíclica, una cetona, un alquilmercaptano, un tiol, etileno glicol, un etileno glicol sustituido, 1-butanotiol, hidrocloreuro de S-(2-amino-4-tiazolilmetil)-isotiourea, 2-mercaptoetanol, 3,4-diclorobencilamina, bencilamina, bencilamina en presencia de disulfuro de carbono, hidroxilamina, 2-fenilindol, n-butilamina, éster dietílico de ácido acetaminomalónico, éster etílico de N-acetil-2-cianoglicina, 3-fenil-4-(o-fluorofenil)-2-butanona, 3,4-difenil-2-butanona, desoxibenzoina, N-metoxiftalimida, cloruro de p-sulfobencenodiazonio, o cloruro de p-sulfamido-bencenodiazonio.

En algunas realizaciones preferidas, el purificador es una resina que contiene una molécula purificadora adecuada unida a ella. Los ejemplos de resinas purificadoras incluyen polímeros que tienen grupos tiol libres y polímeros que

tienen grupos amino libres, por ejemplo una resina amina unida a un polímero en la que la amina está seleccionada entre bencilamina, etilenodiamina, dietilamina, triamina, tris-(2-aminoetil)amina, metilamina, metilguanidina, polilisina, oligolisina, Agropore™ NH₂HL, Agropore™ NH₂LL, resina 4-metoxitritilo, y resina tiol 2-clorotritilo.

5 En algunas realizaciones preferidas, el reactivo de escisión comprende una solución metanólica acuosa de un carbonato de metal del Grupo I o del Grupo II, preferiblemente carbonato potásico metanólico acuoso. En otras realizaciones preferidas, el reactivo de escisión comprende un hidróxido de metal acuoso. En otras realizaciones aún preferidas, el reactivo de escisión comprende un catalizador de transferencia de fase, el cual es una sal de amonio cuaternario, sal de fosfonio cuaternario, éter corona, criptandos (es decir, éteres corona que son bicíclicos o ciclos de orden superior), t-Bu₄N⁺OH, o t-Bu₄N⁺F⁻.

En otras realizaciones preferidas, el reactivo de escisión comprende NaNH₂.

15 En realizaciones preferidas, los oligómeros desprotegidos producidos mediante los procedimientos de la invención, tiene desde 0,001% hasta 1% de aducto de acrilonitrilo, siendo más preferido desde 0,001% hasta 0,5% de aducto de acrilonitrilo, siendo incluso más preferido desde 0,001% hasta 0,1% de aducto de acrilonitrilo, y siendo incluso más preferido desde 0,001% hasta 0,05% de aducto de acrilonitrilo. En realizaciones incluso más preferidas, los oligómeros desprotegidos están libres de aducto de acrilonitrilo.

20 En algunas realizaciones preferidas, las etapas b) y c) se llevan a cabo simultáneamente.

En algunas realizaciones particularmente preferidas, dicha amina alifática es trietilamina o piperidina; dicho disolvente es acetonitrilo o cloruro de metileno; y dicho grupo de protección de fósforo es -CH₂-CH₂-C≡N o -CH₂-(CH=CH)_p-CH₂-C≡N, y en las que el agente de protección, dicho reactivo de escisión, o ambos preferiblemente, comprenden además un purificador tal como se ha definido anteriormente.

En otras realizaciones preferidas, el reactivo de desprotección comprende una alquil amina secundaria, la cual preferiblemente es piperidina, y dicho reactivo de escisión comprende un carbonato de metal alcalino, el cual preferiblemente es carbonato potásico.

30 Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención proporciona procedimientos para la preparación de compuestos oligómeros que tienen fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato u otros enlaces internucleósidos, y a la composición producida mediante los procedimientos.

Los procedimientos de la invención son aplicables tanto a químicas en fase en solución como en fase sólida. Las técnicas representativas en fase en solución se encuentran descritas en la patente de EE.UU. No. 5.210.264, la cual está cedida al cesionario de la presente invención. En algunas realizaciones preferidas, los procedimientos de la presente invención se usan para uso en régimen de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida iterativa. Las técnicas en fase sólida representativas son las típicamente usadas para la síntesis de ADN y ARN que usan la química de fosforamidita convencional (véase, por ejemplo, *Protocols For Oligonucleotides And Analogs*, Agrawal, S., ed., Humana Press, Totowa, NJ, (1993)). Una síntesis preferida de síntesis en fase sólida usa fosforamiditas como compuestos fosfato activados. En esta técnica, un monómero de fosforamidita 5'-protegida se hace reaccionar con un hidroxilo libre sobre la cadena de oligómero en desarrollo para producir un compuesto de fosfito intermedio, el cual posteriormente se oxida al estado P^v usando procedimientos convencionales. Esta técnica se usa comúnmente para la síntesis de diversos tipos de enlaces incluyendo los enlaces fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato.

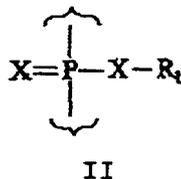
Típicamente, la primera etapa de un procedimiento de este tipo es la unión de un primer monómero o una subunidad de orden superior que contenga un 5'-hidroxilo protegido a un soporte sólido, usualmente a través de un ligador, usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach*, Eckstein, F. Ed., IRL Press, N.Y., (1991). El monómero unido al soporte o primer sintón de orden superior, se trata, a continuación, para eliminar el grupo de protección 5'. El monómero unido al soporte sólido se hace reaccionar, a continuación, con un monómero de fosforoso activado o sintón de orden superior, el cual, típicamente, es un nucleósido fosforamidita, el cual está adecuadamente protegido en el átomo de fósforo, y en cualquier grupo hidroxilo o amino exocíclico vulnerable. Típicamente, el acoplamiento de la fosforoamidita a la cadena de unión al soporte se lleva a cabo bajo condiciones anhidras en la presencia de un agente de activación, tal como, por ejemplo, 1H-tetrazol, 5-(4-nitrofenil)-1H-tetrazol o diisopropilamido tetrazolido.

60 El enlace resultante es un fosfito o tiofosfito, el cual se posteriormente oxidado antes del siguiente ciclo iterativo. La elección del agente de oxidación o sulfuración determinará si el enlace se oxidará o sulfurará para dar un enlace fosfodiéster, tiofosfodiéster, o ditiofosfodiéster.

Al final del régimen de síntesis, la cadena de oligómero unido al soporte se trata, típicamente, con una base fuerte (por ejemplo, hidróxido amónico acuoso al 30%) para escindir el oligonucleótido completado del soporte sólido, y simultáneamente, eliminar los grupos de protección de fósforo (los cuales, típicamente, son grupos de protección β-cianoetilo) y los grupos de protección de nucleobase exocíclicos. Sin desear asociar la invención a ninguna teoría en particular, se estima que la pérdida del grupo de protección de fósforo cianoetilo se produce a través de un mecanis-

mo de β -eliminación, el cual produce acrilonitrilo como un producto. Se estima que el acrilonitrilo reacciona en una adición de Michael con restos hidroxilo y/o amina exocíclica nucleobase, y en particular la posición N³ de restos de timidina, para formar aductos perjudiciales. Los procedimientos de la presente invención reducen de manera significativa el contenido de dichos aductos formados durante la eliminación de los grupos de protección de fósforo que son capaces de participar en dichas reacciones de adición de formación de aductos.

De acuerdo con ello, en un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para la desprotección de un oligómero ligado a fosfato, conteniendo dicho oligómero una pluralidad de enlaces fósforo protegidos de Fórmula II:



en la que X y R_i son tal como se han definido anteriormente, que comprende:

(a) proporcionar una muestra que contiene una pluralidad de dichos oligómeros ligados a fosfato;

(b) la puesta en contacto de dichos oligómeros con un reactivo de desprotección durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para eliminar dichos grupos R_i de dichos oligómeros para formar una pluralidad de oligómeros desprotegidos; en el que dicho reactivo de desprotección comprende al menos una amina alifática, teniendo el ácido conjugado de dicha amina un pKa de desde 8 hasta 11; comprendiendo además dicho reactivo de desprotección uno o más disolventes seleccionados entre el grupo constituido por disolventes alquilo, disolventes haloalquilo, disolventes cianoalquilo, disolventes arilo y disolventes aralquilo, siempre y cuando dicho reactivo de desprotección no comprenda un disolvente de base heterocíclica además de dicha amina alifática; y

(c) la reacción de dichos oligómeros desprotegidos con un reactivo de escisión.

De acuerdo con ello, en algunos procedimientos preferidos de la invención, un oligómero unido a un soporte o en fase de solución conteniendo una pluralidad de grupos de protección de fósforo que son capaces de producir acrilonitrilo, o un producto similar estructuralmente que puede formar un aducto con grupos amino nucleobase, se pone en contacto con un reactivo de desprotección que incluye al menos una amina alifática. La amina se selecciona de forma tal que sea una base suficientemente fuerte como para lograr la eliminación de una mayoría substancial de los grupos de protección de fósforo, pero sea insuficiente fuerte como para ocasionar la desprotonación de la posición N³ de timidina y, por tanto, la activación de dicha posición para la formación del aducto. Se ha encontrado que las aminas adecuadas incluyen aquellas cuyos ácidos conjugados tienen un pKa de desde 8 hasta 11, más preferiblemente de desde 9 hasta 11, incluso más preferiblemente de desde 10 hasta 11. En general, se prefiere que la amina sea una amina alifática de la fórmula R₃N, R₂NH, o RNH₂ en donde R es alquilo. Dos aminas particularmente adecuadas son trietilamina y piperidina.

Tal como se usa aquí, el término “desproteger” o “desprotección” se entiende que significa la eliminación de la vasta mayoría, y más preferiblemente de manera substancial de todos los grupos de protección de fósforo de los oligómeros de interés.

El reactivo de desprotección puede ser o bien una amina alifática, o bien una solución de una o más aminas alifáticas tal como se ha descrito anteriormente. El reactivo de desprotección comprende, además, uno o más disolventes seleccionados entre el grupo constituido por disolventes alquilo, disolventes haloalquilo, disolventes cianoalquilo, disolventes arilo y disolventes aralquilo. Preferiblemente, el disolvente es un disolvente haloalquilo o un disolvente cianoalquilo. Los ejemplos de disolventes particularmente adecuados son acetonitrilo y cloruro de metileno.

En la práctica de la presente invención, se prefiere grandemente que la vasta mayoría de los grupos cianoetilo sean eliminados antes de tratar el oligómero con las condiciones relativamente fuertes del reactivo de escisión (por ejemplo, hidróxido amónico acuoso al 30%). La velocidad de desprotección de grupos β -cianoetilo de los oligonucleótidos se ha mostrado que presenta un marcado efecto disolvente. Por ejemplo, la semivida de un dímero que contiene un único grupo cianoetilo en una solución 1:1, v/v, de trietilamina en acetonitrilo o cloruro de metileno es, muy aproximadamente, de 10 minutos a 25°C, en tanto que la semivida del mismo compuesto en trietilamina-piridina (1:1, v/v) es, aproximadamente, diez veces mayor. Eritja y otros (*Tetrahedron*, vol. 48, págs. 4171-4182, (1992)) recomiendan un tratamiento de tres horas con una solución al 40% de trietilamina en piridina como suficiente para evitar la formación de aducto de acrilonitrilo a restos de timidina en oligonucleótidos posteriormente tratados con DBU. Sin embargo, se ha descubierto que bajo las condiciones descritas por Eritja, muchos de los grupos de protección de cianoetilo se mantendrían intactos. Sin desear asociarse a una teoría específica, se estima que el posterior tratamiento con hidróxido amónico (o cualquier otra base fuerte tal como DBU) conduciría a la formación de niveles inaceptables de restos conteniendo aductos de acrilonitrilo. De acuerdo con ello, en la presente invención el disolvente que está contenido en el reactivo de desprotección no incluye piridina, o disolventes de base heterocíclica similares que podrían

ES 2 296 372 T3

prolongar el tiempo de eliminación de β -cianoetilo unido a un oligómero u otros grupos de protección similares electrónicamente.

5 En la actualidad, el límite detectable de aducto de acrilonitrilo mediante procedimientos de HPLC se estima que es aproximadamente del 0,1%. Sin embargo, se estima que los presentes procedimientos proporcionan oligómeros que tienen tan poco como el 0,001% de dicho aducto. De acuerdo con ello, en realizaciones preferidas, los oligómeros desprotegidos producidos mediante los procedimientos de la invención tienen desde 0,001% hasta 1% de aducto de acrilonitrilo, siendo más preferido desde 0,1% hasta 1% de aducto de acrilonitrilo, y siendo incluso más preferido desde 0,1% hasta 0,75% de aducto de acrilonitrilo, y siendo incluso más preferido desde 0,1% hasta 0,5% de aducto de acrilonitrilo. En realizaciones incluso más preferidas, los oligómeros desprotegidos están libres de aducto de acrilonitrilo detectable.

15 Tal como se usa aquí, el término “aducto de acrilonitrilo” se refiere a aductos de aductos de nucleobase exocíclicos que resultan del acrilonitrilo formado durante la eliminación de grupos de protección de fósforo β -cianoetilo, o aductos similares formados por la eliminación de grupos de protección que forman productos electrónicamente similares tras la eliminación. Los ejemplos representativos de dichos grupos de protección son aquellos que tienen la fórmula:



20 en la que cada R_{10} es H; W es un grupo captador de electrones; y p es 1 hasta 3. El término “grupo captador de electrones” se entiende que tiene su significado reconocido en la técnica como un resto químico que atrae densidad de electrones, ya sea a través de efectos de resonancia o inductivos. Los ejemplos de grupos captadores de electrones son ciano, nitro, halógeno, fenil substituido en la posición para u orto con uno o más grupos halógeno, nitro o ciano, y grupos trihalometilo. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente otros grupos captadores de electrones, así como otros grupos de protección de fósforo que tienen potencial similar para formar aductos con funciones hidroxilo o amino exocíclico.

30 Después de la puesta en contacto con el reactivo de desprotección, los oligómeros pueden lavarse adicionalmente antes de la reacción con un reactivo de escisión, o hacerse reaccionar con el reactivo de escisión directamente. El reactivo de escisión es una solución que incluye un único reactivo o una combinación de reactivos que efectúan la escisión del oligómero desprotegido de un soporte sólido, y/o, cuando el oligómero está en solución, efectúan la escisión de los grupos de protección exocíclicos, por ejemplo hidróxido amónico acuoso al 30%.

35 En los procedimientos de la invención, es generalmente ventajoso efectuar la eliminación de substancialmente todos los grupos de protección de fósforo de los oligómeros, y la separación del acrilonitrilo o productos de tipo acrilonitrilo de los oligómeros antes de la exposición de los oligómeros a las condiciones básicas más severas que efectúan la escisión del soporte sólido, o la eliminación de los grupos de protección hidroxilo y/o exocíclicos. De acuerdo con ello, en algunas realizaciones preferidas, se usa una etapa de lavado entre el contacto con el reactivo de desprotección y el reactivo de escisión. En algunas realizaciones preferidas, la etapa de lavado se lleva a cabo usando uno o más disolventes adecuados, por ejemplo acetónitrilo o cloruro de metileno. En otras realizaciones preferidas, el lavado se lleva a cabo con un reactivo de lavado que contiene una o más aminas tal como se usan en el reactivo de desprotección.

45 En algunas realizaciones particularmente preferidas, puede incluirse un purificador en el reactivo de desprotección, reactivo de escisión, reactivo de lavado, o combinaciones de los mismos. El purificador es una molécula que reacciona con el acrilonitrilo o productos tipo acrilonitrilo de desprotección, reduciendo la posibilidad de formación de aducto nucleobase. El purificador puede seleccionarse entre mercaptanos, beta amino tioles, fosfinas, fosfitos, dienos, ureas, tioureas, amidas, imidas, imidas cíclicas y cetonas. Otros purificadores útiles incluyen alquilmcaptanos, tioles, etileno glicol, etileno glicoles substituidos, 1-butanotiol, hidrocioruro de S-(2-amino-4-tiazolilmetil)isotiourea, 2-mercaptoetanol, 3,4-dicloro-bencilamina, bencilamina, bencilamina en la presencia de disulfuro de carbono, hidroxilamina, 2-fenilindol, n-butilamina, éster dietílico de ácido acetaminomalónico, éster etílico de N-acetil-2-cianoglicina, 3-fenil-4-(o-fluorofenil)-2-butanona, 3,4-difenil-2-butanona, desoxibenzoina, -metoxifitalimida, cloruro de p-sulfobenceno-diazonio, cloruro de p-sulfamidobencenodiazonio.

55 En algunas realizaciones preferidas, el purificador es una resina que contiene una molécula purificadora adecuada unida a él. Los ejemplos de resinas purificadoras incluyen polímeros que tienen grupos tiol libres y polímeros que tienen grupos amino libres, por ejemplo una resina amina unida a un polímero en la que la amina está seleccionada entre bencilamina, etilenodiamina, dietilamina, triamina, tris-(2-aminoetil)amina, metilamina, metilguanidina, polilisina, oligolisina, AgroporeTM NH₂HL, AgroporeTM NH₂LL, resina 4-metoxitritilo, y resina tiol 2-clorotritilo.

60 Los procedimientos de la presente invención son útiles para la preparación de compuestos oligómeros que contienen subunidades monómeras que están unidas mediante una diversidad de enlaces, incluyen enlaces fosfito, fosfodiéster, fósforotioato, y/o fósforoditioato.

65 Tal como se usan aquí, los términos “oligómero” o “compuesto oligómero” se usan para referirse a compuestos que contienen una pluralidad de subunidades de monómero nucleósido las cuales están unidas mediante enlaces internucleósidos, preferiblemente enlaces que contienen fósforo, tales como enlaces fosfito, fosfodiéster, fósforotioato, y/o

fósforoditioato. De acuerdo con ello, el término “compuesto oligómero” incluye oligonucleótidos que se producen de manera natural, sus análogos, y oligonucleótidos sintéticos.

5 En algunas realizaciones preferidas de los compuestos de la invención, el sustituyente W puede ser un grupo captador de electrones seleccionado de manera tal que facilita el ataque por un nucleófilo. De acuerdo con ello, W puede ser cualquiera de entre una diversidad de sustituyentes captadores de electrones, siempre y cuando que no interfiera por otra parte con los procedimientos de la invención. Los grupos W captadores de electrones no-sililo preferidos incluyen ciano, NO₂, grupos alcarilo, grupos sulfoxilo, grupos sulfonilo, grupos tio, grupos sulfoxilo sustituidos, grupos sulfonilo sustituidos, o grupos tio sustituidos, en los que los sustituyentes están seleccionados entre el grupo constituido por alquilo, arilo, o alcarilo. Particularmente preferidos son los grupos alcanilo que tienen la fórmula R-C(=O)- en la que R es un grupo alquilo de desde 1 hasta seis carbonos, siendo especialmente preferidos los grupos acetilo. W puede ser igualmente un resto sililo trisustituido, en el que los sustituyentes son alquilo, arilo o ambos.

15 En algunas realizaciones preferidas, el purificador es una resina que contiene una molécula purificadora adecuada unida a él. Los ejemplos de resinas purificadoras incluyen polímeros que tienen grupos tiol libres y polímeros que tienen grupos amino libres, por ejemplo una resina amina unida a un polímero en la que la amina está seleccionada entre bencilamina, etilenodiamina, dietilamina, triamina, tris-(2-aminoetil)amina, metilamina, metilguanidina, polilisisina, oligolisina, Agropore™ NH₂HL, Agropore™ NH₂LL (disponible de Aldrich Chem. Co. St. Louis, Mo.), resina 20 4-metoxitritilo, y resina tiol 2-clorotritilo.

Cuando se usa como parte del reactivo de escisión, el contacto con ión fluoruro se efectúa preferiblemente en un disolvente tal como tetrahidrofurano, acetonitrilo, dimetoxietano, o agua. Preferiblemente, el ión fluoruro se proporciona en forma de una o más sales seleccionadas entre fluoruros de tetraalquilamonio (por ejemplo, fluoruro de 25 tetrabutilamonio (TBAF)), fluoruro potásico, fluoruro de cesio, o fluoruro ácido de trietilamonio.

La presente invención es aplicable a la preparación de oligómeros ligados a fosfato que tienen una diversidad de enlaces internucleósidos, incluyendo enlaces fosfito, fosfodiéster, fósforotioato, y fósforoditioato, y otros enlaces conocidos en la técnica.

30 En realizaciones preferidas, los procedimientos de la invención se usan para la preparación de compuestos oligómeros incluyendo oligonucleótidos y sus análogos. Tal como se usa aquí, el término “análogo de nucleótido” significa compuestos que pueden contener tanto restos que se producen de manera natural (es decir, “natural”) como producidos de manera no natural (“sintéticos”), por ejemplo, subunidades nucleosídicas que contienen azúcar modificado y/o porciones nucleobase. Dichos análogos oligonucleótidos son estructuralmente distinguibles, además de funcionalmente intercambiables, de oligonucleótidos que se producen de manera natural o de tipo salvaje sintéticos. De acuerdo con ello, los análogos de nucleótidos incluyen todas las estructuras que funcionan de manera eficaz para imitar la estructura y/o función de una hebra de ARN o ADN deseada, por ejemplo, mediante hibridación a una diana. El término 40 nucleósido sintético para los fines de la presente invención, se refiere a un nucleósido modificado. Las modificaciones representativas incluyen la modificación de una porción base heterocíclica de un nucleósido para proporcionar una nucleobase que se produce de manera no natural, una porción azúcar de un nucleósido, o ambas simultáneamente.

Las nucleobases representativas útiles en los compuestos y procedimientos aquí descritos incluyen adenina, guanina, citosina, uracilo, y timina, así como otras nucleobases que se producen de manera natural y no natural tales como 45 xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros alquil derivados de adenina y guanina, 2-propilo y otros alquil derivados de adenina y guanina, 5-halo uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, oxa, amino, tiol, tioalquilo, hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidas, 7-metilguanina. Otras nucleobases que se producen de manera natural y no natural incluyen las descritas en la patente de EE.UU. No. 3.687.808 (Merigan, y otros), en el capítulo 15 por Sanghvi, en *Antisense Research and Application*, Ed. S.T. Crooke and B. Lebleu, CRC Press, (1993), en Englisch y otros, *Angewandte Chemie, International Edition*, vol. 30, págs. 613-722 (véanse especialmente las páginas 622 y 623), (1991), y en la *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, J.I. Kroschwitz Ed., John Wiley & Sons, págs. 858-859, (1990), Cook, P.D., *Anti-Cancer Drug Design*, vol. 6, págs. 585-607, (1991).

55 El término “base nucleósida” se entiende además que incluye compuestos heterocíclicos que pueden servir como bases nucleósidas que incluyen ciertas “bases universales” que no son bases nucleósidas en el sentido más clásico pero que sirven como bases nucleósidas. Especialmente mencionada como una base universal es el 3-nitropirrol.

Tal como se usa aquí, el término “alquido” incluye pero sin limitarse a ellos, grupos de hidrocarburos de cadena 60 recta, cadena ramificada, y alicíclicos. Los grupos alquilo de la presente invención pueden estar sustituidos. Los sustituyentes alquilo representativos están descritos en la patente de EE.UU. No. 5.212.295, en la columna 12, líneas 41-50.

Tal como se usa aquí, el término “aralquilo” indica grupos alquilo que portan grupos arilo, por ejemplo, grupos 65 bencilo. El término “alcarilo” indica grupos arilo que portan grupos alquilo, por ejemplo, grupos metilfenilo. Los grupos “arilo” son compuestos cíclicos aromáticos que incluyen, pero sin limitarse a ellos, fenilo, naftilo, antracilo, fenantrilo, pirenilo, y xililo.

ES 2 296 372 T3

Tal como se usa aquí, el término “alcanoilo” tiene su significado acostumbrado como un grupo de fórmula -C(=O)-alquilo. Un grupo alcanoilo preferido es el grupo acetoilo.

En general, el término “hetero” indica un átomo distinto del carbono, preferiblemente pero no exclusivamente N, O, o S. De acuerdo con ello, el término “heterocicloalquilo” indica un sistema de anillo alquilo que tiene uno o más heteroátomos (es decir, átomos distintos del carbono). Los grupos heterocicloalquilo preferidos incluyen, por ejemplo, grupos morfolino. Tal como se usa aquí, el término “heterocicloalquenilo” indica un sistema de anillo que tiene uno o más dobles enlaces, y uno o más heteroátomos. Los grupos heterocicloalquenilo preferidos incluyen, por ejemplo, grupos pirrolidino.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, los oligómeros pueden estar enlazados conectados a un soporte sólido. Los soportes sólidos son substratos que son capaces de servir como la fase sólida en procedimientos de síntesis en fase sólida, tales como los descritos por Caruthers en las patentes de EE.UU. Nos. 4.415.732; 4.458.066; 4.500.707; 4.668.777; 4.973.679; y 5.132.418; y Koster, en las patentes de EE.UU. Nos. 4.725.677 y Re. 34.069. Los conectores son conocidos en la técnica como moléculas cortas que sirven para conectar un soporte sólido a grupos funcionales (por ejemplo, grupos hidroxilo) de moléculas síntón iniciales en técnicas de síntesis en fase sólida. Los conectores adecuados están descritos, por ejemplo, en *Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach*, Eckstein, F. Ed., IRL Press, N.Y., Capítulo 1, págs. 1-23, (1991). Otros conectores incluyen el conector “TAMRA” descrito por Mullah y otros, en *Tetrahedron Letters*, vol. 38, págs. 5751-5754, (1997), y el “conector-Q” descrito por Pon y otros, en *Nucleic Acid Research*, vol. 25, págs. 3629-3635, (1997).

Los soportes sólidos de acuerdo con la invención incluyen los generalmente conocidos en la técnica por ser adecuados para uso en procedimientos en fase sólida, incluyendo, por ejemplo, vidrio de poro controlado (CPG), oxalilovidrio de poro controlado (véase, por ejemplo, Alul, y otros, *Nucleic Acids Research*, vol. 19, pág. 1527, (1991). El TentaGel Support, un soporte derivatizado de aminopolietilenoglicol (véase, por ejemplo, Wright, y otros, *Tetrahedron Letters*, vol. 34, pág. 3373, (1993), y Poros, un copolímero de poliestireno/divinilbenceno.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, los grupos hidroxilo pueden estar protegidos con un grupo de protección hidroxilo. En los procedimientos de la invención, pueden usarse una amplia variedad de grupos de protección hidroxilo. Preferiblemente, el grupo de protección es estable bajo condiciones básicas pero puede ser eliminado bajo condiciones ácidas. En general, los grupos de protección hacen que las funcionalidades químicas sean inertes a las condiciones específicas de la reacción, y pueden ser agregados y eliminados de dichas funcionalidades en una molécula sin dañar substancialmente al resto de la molécula. Los grupos de protección hidroxilo representativos han sido descritos por Beaucage, y otros, en *Tetrahedron*, vol. 48, págs. 2223-2321, (1992), e igualmente por Greene y Wuts, en *Protective Groups in Organic Synthesis*, Capítulo 2, 2d ed., John Wiley & Sons, New York, (1991). Los grupos de protección preferidos usados para R₂, R₃ y R_{3a} incluyen dimetoxitritilo (DMT), monometoxitritilo, 9-fenilxanten-9-ilo (Pyxilo) y 9-(p-metoxifenil)xanten-9-ilo (Mox). El grupo de protección hidroxilo puede eliminarse de los compuestos oligómeros de la invención mediante técnicas bien conocidas en la técnica, para formar el hidroxilo libre. Por ejemplo, pueden eliminarse grupos de protección dimetoxitritilo mediante ácidos próticos tales como ácido fórmico, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido p-tolueno sulfónico o con ácidos de Lewis tal como por ejemplo bromuro de cinc. Véase, por ejemplo, Greene y Wuts, citados anteriormente.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, los grupos amino se agregan a alquilo u otros grupos tales como, por ejemplo, grupos 2°-alcoxi. Dichos grupos amino están igualmente comúnmente presentes en nucleobases que se producen de manera natural y de manera no natural. Generalmente, se prefiere que estos grupos amino estén en forma protegida durante la síntesis de los compuestos oligómeros de la invención. Los grupos de protección amino representativos adecuados para estos fines han sido expuestos por Greene y Wuts, en *Protective Groups in Organic Synthesis*, Capítulo 7, 2d ed., John Wiley & Sons, New York, (1991). Generalmente, tal como se usa aquí, el término “protegido” cuando se usa en relación con un resto molecular tal como “nucleobase”, indica que el resto molecular contiene una o más funcionalidades protegidas por grupos de protección.

Los agentes sulfurantes usados durante la oxidación para formar enlaces fósforotioato y fósforoditioato incluyen el reactivo de Beaucage (véase, por ejemplo, Iyer, R.P., y otros, *J. Chem. Soc.*, vol. 112, págs. 1253-1254, (1990), y Iyer, R.P., y otros, *J. Org. Chem.*, vol. 55, págs. 4693-4699, (1990)); 3-metil-1,2,4-triazolin-5-ona (MEDITH; Zong, y otros, *Tetrahedron Lett.*, vol. 40, pág. 2095, (1999)); disulfuro de tetraetiltiouram (véase, por ejemplo, Vu, H., Hirschbein, B.L., *Tetrahedron Lett.*, vol. 32, págs. 3005-3008, (1991)); tetrasulfuro de dibenzoilo (véase, por ejemplo, Rao, M.V., y otros, *Tetrahedron Lett.*, vol. 33, págs. 4839-4842, (1992)); disulfuro de di(fenilacetilo) (véase, por ejemplo, Kamer, P.C.J., *Tetrahedron Lett.*, vol. 30, págs. 6757-6760, (1989)); disulfuro de bis-(O-O-disopropoxi fosfnotiolo) (véase Stec y otros, *Tetrahedron Lett.*, vol. 34, págs. 5317-5320, (1993); 3-etoxi-1,2,4-ditiazolin-5-ona (véase, *Nucleic Acids Research*, vol. 24, págs. 1602-1607, (1996), y *Nucleic Acids Research*, vol. 24, págs. 3643-3644, (1996)); disulfuro de bis(p-clorobencenosulfonilo) (véase *Nucleic Acids Resarch*, vol. 23, págs. 4029-4033, (1995)); azufre, azufre en combinación con ligandos tipo triaril, trialquil, triaralquil, o triarcaril fosfinas.

Los agentes de oxidación útiles usados para formar los enlaces fosfodiéster o fósforotioato incluyen yodo/tetrahidrofurano/agua/piridina o peróxido de hidrógeno/agua o hidroperóxido de terc-butilo o cualquier otro perácido tipo ácido m-cloroperbenzoico. En el caso de sulfuración, la reacción se lleva a cabo bajo condiciones anhidras con la exclusión de aire, en particular oxígeno, en tanto que en el caso de oxidación la reacción puede llevarse a cabo bajo condiciones acuosas.

Los oligonucleótidos o análogos de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención hibridables a una diana específica, comprenden, preferiblemente, desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 100 subunidades de monómero. Es más preferido que dichos compuestos comprendan desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 50 subunidades de monómeros, más preferiblemente 10 hasta aproximadamente 30 subunidades de monómeros, siendo particularmente preferido con 15 hasta 25 subunidades de monómeros. Cuando se usan como “bloques de construcción” en el ensamblado de compuestos oligómeros más grandes, se prefieren compuestos oligómeros más pequeños. Pueden prepararse bibliotecas de compuestos dímeros, trímeros o de orden superior mediante el procedimiento de la invención. El uso de pequeñas secuencias sintetizadas mediante químicas en fase de solución en síntesis automatizadas de oligonucleótidos más grandes potencia la eficacia del acoplamiento y la pureza de los oligonucleótidos finales. Véase, por ejemplo: Miura, K., y otros, *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 35, págs. 833-836, (1987); Kumar, G. y Poonian, M.S., *J. Org. Chem.*, vol. 49, págs. 4905-4912, (1984); Bannwarth, W., *Helvetica Chimica Acta*, vol. 68, págs. 1907-1913, (1985); Wolter, A., y otros, *Nucleosides and Nucleotides*, vol. 5, págs. 65-77, (1986).

La presente invención es adecuada para la preparación de oligómeros que pueden tener una amplia variedad de grupos sustituyentes 2'. Tal como se usa aquí, el término “grupo sustituyente 2'” incluye grupos unidos en la posición 2' del resto azúcar con o sin un átomo de oxígeno. Las modificaciones 2'-azúcar adecuadas para la presente invención incluyen fluoro, O-alquilo, O-alquilamino, O-alquilalcoxi, O-alquilamino protegido, O-alquilaminoalquilo, O-alquilimidazol, y poliéteres de la fórmula (O-alquiló)_m, en donde m es aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10. Los preferidos entre estos poliéteres son polietileno glicoles (PEGs) lineales y cíclicos, y grupos que contienen (PEG), tales como éteres corona y los que han sido descritos por Ouchi, y otros, *Drug Design and Discovery*, vol. 9, pág. 93, (1992), Ravasio, y otros, *J. Org. Chem.*, vol. 56, pág. 4329, (1991), y Delgado, y otros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 9, pág. 249, (1992). Otras modificaciones de azúcar han sido descritas por Cook, P.D., *Anti-Cancer Drug Design*, vol. 6, págs. 585-607, (1991). La sustitución con fluoro, O-alquilo, O-alquilamino, O-alquilimidazol, O-alquilaminoalquilo y alquilamino se encuentra descrita en la Solicitud de patente de EE.UU. número de serie 08/398.901, presentada el 6 de Marzo de 1995, titulada Compuestos Oligómeros que tienen nucleótidos de pirimidina con sustituciones 2' y 5'.

Los sustituyentes 2'-O-azúcar representativos de fórmula XII se encuentran descritos en la Solicitud de patente de EE.UU. número de serie 09/130.973, presentada el 7 de Agosto de 1998, titulada Oligonucleótidos con terminación 2'-oxietoxi.

Los azúcares que tienen O-sustituciones sobre el anillo ribosilo son igualmente adecuados para la presente invención. Las sustituciones representativas para el O del anillo incluyen S, CH₂, CHF, y CF₂, véase, por ejemplo, Secrist, y otros, *Abstract 21, Program & Abstracts, Tenth Internacional Roundtable, Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications*, Park City, Utah, Sept. 16-20, (1992).

Los sustituyentes 2'-O-azúcar cíclicos representativos de fórmula XIII se encuentran descritos en la Solicitud de patente de EE.UU. número de serie 09/123.108, presentada el 27 de Julio de 1998, titulada Oligonucleótidos 2'-modificados identificados a ARN que están preorganizados de acuerdo con una conformación.

En un aspecto de la invención, los compuestos de la invención se usan para modular ARN o ADN, que codifican una proteína cuya formación o actividad se desea modular. La porción identificada de la composición a usar es, de esta forma, seleccionada de manera que sea complementaria a la porción preseleccionada de ADN o ARN, es decir que sea hibridable a dicha porción.

Los compuestos y composiciones oligómeras de la invención pueden usarse en diagnósticos, terapéuticos y como reactivos de investigación y kits. Pueden usarse en composiciones farmacéuticas mediante la inclusión de un diluyente o vehículo aceptable farmacéuticamente adecuado. Además, pueden usarse para el tratamiento de organismos que tengan una enfermedad caracterizada por la producción no deseada de una proteína. El organismo debería ponerse en contacto con un oligonucleótido que tenga una secuencia que sea capaz de hibridarse de manera específica con una hebra de ácido nucleico que codifica la proteína no deseada. Los tratamientos de este tipo pueden ponerse en práctica sobre una diversidad de organismos abarcados desde organismos eucarióticos y procarióticos unicelulares hasta organismos eucarióticos multicelulares. Cualquier organismo que use la transcripción ADN-ARN o la traducción ARN-proteína como una parte fundamental de su control hereditario, metabólico o celular, es susceptible al tratamiento terapéutico y/o profiláctico de acuerdo con la invención. Aparentemente, pueden tratarse diversos organismos tales como bacterias, levaduras, protozoos, algas todas las plantas y formas animales superiores, incluyendo animales de sangre caliente. Además, puede tratarse cada célula de eucariotes multicelulares, puesto que ellas incluyen tanto la transcripción ADN-ARN como la traducción ARN-proteína como partes integrales de su actividad celular. Además, muchos de los orgánulos (por ejemplo, mitocondrias y cloroplastos) de células eucarióticas incluyen igualmente mecanismos de transcripción y de traducción. De acuerdo con ello, las células individuales, poblaciones celulares u orgánulos pueden incluirse igualmente dentro de la definición de organismos que pueden ser tratados con oligonucleótidos terapéuticos o de diagnóstico.

Tal como se admitirá, las etapas de los procedimientos de la presente invención no necesitan llevarse a cabo en ningún número determinado veces ni en ninguna secuencia particular. Los ejemplos siguientes están destinados a ser ilustrativos y no están destinados a ser limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *Ejemplo comparativo: Presente invención frente al procedimiento de la técnica anterior de Eritja y otros*

10 El tratamiento de fósforotioatos de oligonucleótidos cianoetil-protectados con hidróxido amónico dio como resultado la generación de un equivalente de acrilonitrilo (AN) por enlace fósforotioato. En la presencia de hidróxido amónico un pequeño porcentaje de restos de timidina reaccionó con el AN liberado para formar restos N³-cianoetiltimidina (CN-T).

El nonanodecatimidiniloctadecafósforotioato (T-19 P=S) se sintetizó y desprotegió bajo tres conjuntos de condiciones:

15 (a) Hidróxido amónico, 60°C, 16 horas;

(b) Trietilamina-piridina (2:3, v/v), 25°C, 3 horas y, a continuación, hidróxido amónico, 60°C, 16 horas;

20 (c) Trietilamina-acetonitrilo (1:1, v/v), 25°C, 12 horas y, a continuación, hidróxido amónico, 60°C, 16 horas.

El segundo conjunto de condiciones son las recomendadas por Eritja. Los oligonucleótidos brutos obtenidos mediante evaporación de los lisatos de hidróxido amónico se destritilaron y se inspeccionaron mediante cromatografía líquida-espectroscopia de masa (LC-MS) con el fin de cuantificar la cantidad de CN-T presente. Se mostró que los niveles de CN-T en muestras de T-19 P=S sometidas a las condiciones a), b) y c) fueron de aproximadamente 15%, 2% y menos de 0,1%, respectivamente.

Los resultados demuestran que las condiciones propuestas por Eritja conducen a la formación de oligonucleótidos que contienen aún altos niveles de restos CN-T, en tanto que los procedimientos de la presente invención suprimen la formación de CN-T hasta un nivel por debajo del límite de detección del ensayo.

30
Ejemplo 2

Síntesis de 20-mero de 5'-d(TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T)-3' fósforotioato completamente modificado

35 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 30 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destritilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las fosforamiditas se realizó con una solución 0,45 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo usando una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1, v/v) durante 1 minuto. Al final de la síntesis, el soporte se lavó con una solución de trietilamina en acetonitrilo (1:1, v/v) durante 12 horas, se escindió, se desprotegió y se purificó de la manera usual.

45
Ejemplo 3

Síntesis de 20-mero de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fósforotioato completamente modificado

50 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 160 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destritilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las fosforamiditas se realizó con una solución 0,45 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo 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, el soporte se lavó con una solución de trietilamina en acetonitrilo (1:1, v/v) durante 12 horas, se escindió, se desprotegió y se purificó de la manera usual.

55
Ejemplo 4

Síntesis de 20-mero de 5'-d(TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T)-3' fósforotioato completamente modificado

60 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 30 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destritilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las fosforamiditas se realizó con una solución 0,45 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo usando una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1, v/v) durante 1 minuto. Al final de la síntesis, el soporte se transfirió a un envase, se agitó con una solución de trietilamina en acetonitrilo (1:1, v/v) durante 12 horas, se filtró y, a continuación, se trató con hidróxido amónico acuoso al 30%, se escindió, se desprotegió y se purificó de la manera usual.

ES 2 296 372 T3

Ejemplo 5

Síntesis de 20-mero de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fósforotioato completamente modificado

5 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 160 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destrilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las fosforamiditas se realizó con una solución 0,45 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo usando una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1, v/v) durante 2 minutos. Al final
10 de la síntesis, el soporte se transfirió a un envase, se agitó con una solución de trietilamina en acetonitrilo (1:1, v/v) durante 12 horas, se filtró y, a continuación, se trató con hidróxido amónico acuoso al 30%, se escindió, se desprotegió y se purificó de la manera usual.

15 Ejemplo 6

Síntesis de 20-mero de 5'-d(TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T)-3' fósforotioato completamente modificado

20 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 30 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destrilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las fosforamiditas se realizó con una solución 0,45 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo usando una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1, v/v) durante 1 minuto. Al final
25 de la síntesis, el soporte se recogió en hidróxido amónico acuoso al 30% conjuntamente con timidina, se escindió, se desprotegió y se purificó de la manera usual.

Ejemplo 7

30 *Síntesis de 20-mero de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fósforotioato completamente modificado*

La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 160 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destrilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de
35 las fosforamiditas se realizó con una solución 0,45 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo 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, el soporte se recogió en hidróxido amónico acuoso al 30% conjuntamente con timidina, se escindió, se desprotegió y se purificó de la manera usual.

40

Ejemplo 8

Síntesis de 20-mero de 5'-d(TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T)-3' fósforotioato completamente modificado

45 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 30 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destrilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las fosforamiditas se realizó con una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo usando una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1, v/v) durante 1 minuto. Al final
50 de la síntesis, el soporte se recogió en hidróxido amónico acuoso al 30% conjuntamente con uridina, se escindió, se desprotegió y se purificó de la manera usual.

Ejemplo 9

55

Síntesis de 20-mero de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fósforotioato completamente modificado

La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 160 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destrilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de
60 las fosforamiditas se realizó con una solución 0,45 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo 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, el soporte se recogió en hidróxido amónico acuoso al 30% conjuntamente con uridina, se escindió, se desprotegió y se purificó de la manera usual.

65

ES 2 296 372 T3

Ejemplo 10

Síntesis de 20-mero de 5'-d(TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T)-3' fósforotioato completamente modificado

5 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala
30 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia.
La destritilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de
las fosforamiditas se realizó con una solución 0,45 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo
10 usando una solución 0,2 M de disulfuro de fenilacetilo en acetonitrilo:3-picolina (1:1, v/v) durante 1 minuto. Al final
de la síntesis, el soporte se recogió en hidróxido amónico acuoso al 30% conjuntamente con imidazol, se escindió, se
desprotegió y se purificó de la manera usual.

Ejemplo 11

Síntesis de 20-mero de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fósforotioato completamente modificado

15 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala
160 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia.
20 La destritilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de
las fosforamiditas se realizó con una solución 0,45 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo
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, el soporte se recogió en hidróxido amónico acuoso al 30% conjuntamente con imidazol, se escindió, se
desprotegió y se purificó de la manera usual.

Ejemplo 12

Fabricación BPF de 20-mero de 5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3' fósforotioato completamente modificado (ISIS 2302) sobre OligoProcess

30 El ISIS 2302 [5'-d(GCC-CAA-GCT-GGC-ATC-CGT-CA)-3'] se fabricó bajo condiciones de Buena Práctica de
Fabricación (BPF) sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 150 micromol usando las cianoetil
fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destritilación se llevó a cabo
35 usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las fosforamiditas se realizó con
una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo 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, el soporte se
lavó con una solución de trietilamina en acetonitrilo (1:1, v/v) durante 30 minutos y, a continuación, se dejó reposar a
temperatura ambiente durante una noche, se filtró, se lavó con disolvente de acetonitrilo y, a continuación, se trató con
40 hidróxido amónico acuoso al 30%, se escindió, se desprotegió y se purificó de la manera usual. El oligonucleótido se
analizó mediante espectroscopia de masa para confirmar la eliminación del aducto de acrilonitrilo.

Ejemplo 13

Síntesis de 20-mero de 5'-d(TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T)-3' fósforotioato completamente modificado

45 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala
30 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia.
50 La destritilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de
las fosforamiditas se realizó con una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo
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, el soporte se incubó con nucleósido de timidina (20 equivalentes), se desprotegió y se purificó de la
manera usual.

Ejemplo 14

Síntesis de 20-mero de 5'-d(TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T)-3' fósforotioato completamente modificado

60 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala
30 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia.
La destritilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las
fosforamiditas se realizó con una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo usando
65 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, el soporte se incubó con nucleósido de uridina (20 equivalentes), se desprotegió y se purificó de la manera
usual.

ES 2 296 372 T3

Ejemplo 15

Síntesis de 20-mero de 5'-d(TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T)-3' fósforotioato completamente modificado

5 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 30 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destritilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las fosforamiditas se realizó con una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo 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, el soporte se incubó con nucleósido de inosina (20 equivalentes), se desprotegió y se purificó de la manera usual.

Ejemplo 16

15 *Síntesis de 20-mero de 5'-d(TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T)-3' fósforotioato completamente modificado*

La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 30 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destritilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las fosforamiditas se realizó con una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo 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, el soporte se incubó con timidina (25 equivalentes), se desprotegió y se purificó de la manera usual.

Ejemplo 17

Síntesis de 20-mero de 5'-d(TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T)-3' fósforotioato completamente modificado

30 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 30 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destritilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las fosforamiditas se realizó con una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo 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, el soporte se incubó con uracilo (25 equivalentes), se desprotegió y se purificó de la manera usual.

Ejemplo 18

Síntesis de 20-mero de 5'-d(TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T)-3' fósforotioato completamente modificado

40 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 30 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destritilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las fosforamiditas se realizó con una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo 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, el soporte se incubó con imidazol (50 equivalentes), se desprotegió y se purificó de la manera usual.

Ejemplo 19

Síntesis de 20-mero de 5'-d(TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T)-3' fósforotioato completamente modificado

55 La síntesis de la secuencia anterior se llevó a cabo sobre un sintetizador OligoPilot I de Pharmacia sobre una escala 30 micromol usando las cianoetil fosforamiditas obtenidas de Pharmacia y el soporte primario HL 30 de Pharmacia. La destritilación se llevó a cabo usando ácido dicloroacético al 3% en tolueno (volumen/volumen). La activación de las fosforamiditas se realizó con una solución 0,4 M de 1H-tetrazol en acetonitrilo. La sulfuración se llevó a cabo 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, el soporte se incubó con bencil mercaptano (50 equivalentes), se desprotegió y se purificó de la manera usual.

Ejemplos 20-27

Síntesis de oligonucleótidos

65 Se ensamblaron oligodesoxinucleótidos sobre un sintetizador de ADN ABI 380B usando química de fosforamida CPG1 derivatizada con 3'-O-(carboximetil-oxi)acetato de 5'-O-(4,4'-dimetoxi-tritil) nucleósido (mostrada en el Esquema 1, a continuación), y o bien un oxidante comercial o bien 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona (0,05 M en MeCN) como el reactivo de transferencia de azufre.

ES 2 296 372 T3

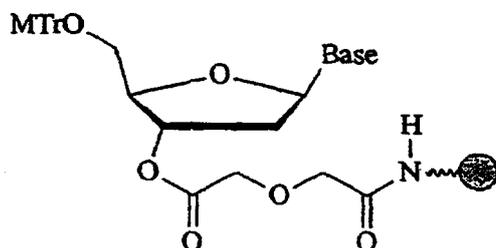
Esquema 1

Soportes sólidos

5

10

15



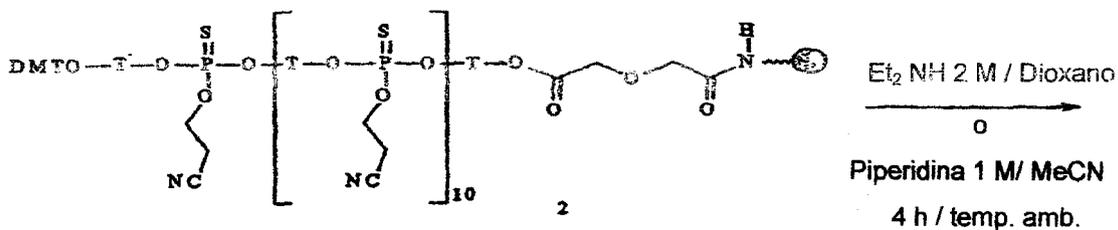
20

Esquema 2

Desprotección y liberación del oligonucleótido 5 del soporte sólido

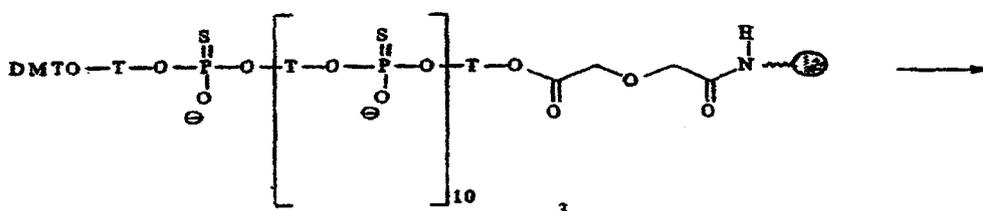
25

30



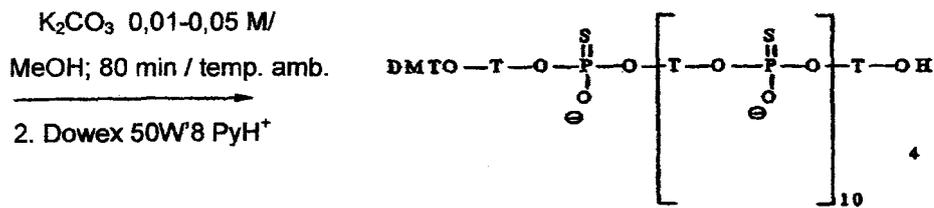
35

40



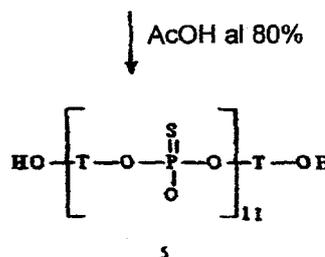
45

50



55

60



65

Se usaron desoxinucleósido CE fosoramiditas protegidas de una manera convencional (A^{bz} , C^{bz} , G^{ib}) para sintetizar oligonucleótidos presentes en los Ejemplos 21, 23-27. Los usados para la preparación de oligonucleótidos presentes en los Ejemplos 20 y 22 se protegieron de manera uniforme o bien con grupos fenoxiacetilo (PAC) o bien con 4-(t-butil)fenoxiacetilo (tBPA).

ES 2 296 372 T3

Ejemplo 20

Dos etapas de desprotección de oligonucleótidos con aminas secundarias en un disolvente orgánico seguido de K_2CO_3 metabólico

5 El procedimiento de desprotección se ejemplifica en el Esquema 2 para dodecatimidilato 5. Después de completar la síntesis del oligonucleótido se descianoetiló 2 unido a un soporte sólido o bien con dietilamina 2 M o bien piperidina 1 M en MeCN, dioxano, THF, o DMF (3 ml) durante 2 horas hasta 12 horas. La columna se lavó con dioxano (10 ml), proporcionando 3. En esta etapa, pueden usarse igualmente otras aminas, por ejemplo, morfolina, pirrolidina, o dimetilamina.

15 El oligonucleótido 4 se separó del soporte sólido 3 mediante tratamiento con K_2CO_3 0,01 hasta 0,05 M en MeOH (2,5 ml y 2,20 ml para síntesis 1 y 15 mmol, respectivamente). Cada porción se pasó a la ida y la vuelta a través de la columna durante 45 minutos, se neutralizó pasándola a través de una columna corta con Dowex 50W[®]8 (PyH⁺; 1 ml aproximadamente). Los eluatos combinados se evaporaron hasta sequedad, se co-evaporaron con MeCN (10 ml), y se disolvieron en agua. El oligonucleótido diana 4 se aisló mediante RP-HPLC sobre una columna C18 de 300Å y 15 mm Delta Pak (3,9x300 mm y 7,8x300 mm para síntesis de 1 y 15 mmol, respectivamente), usando NH_4OAc 0,1 M como tampón A, MeCN acuoso al 80% como tampón B, y un gradiente lineal de B de desde 0 hasta 60% en 40 minutos a una velocidad de flujo de 1,5 y 5 ml.min⁻¹, respectivamente. Las fracciones recogidas se evaporaron y se destritaron con AcOH acuoso al 80% durante 30 minutos a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó, el producto se redisolvió en agua y se desaló inyectándolo sobre la misma columna y, a continuación, se lavó con agua (10 minutos), eluyéndose un oligonucleótido 5 en forma de una sal de amonio con MeCN acuoso al 50% (20 minutos). La homogeneidad de 5 se caracterizó mediante RP-HPLC y electroforesis capilar. ESMS: 3764,2 (encontrado); 3756,1 (calculado).

25 La eficacia del procedimiento de desprotección se verificó en la preparación de los oligonucleótidos fosforotioatos 6 y 7 (Isis 1939) y el fosfodiéster oligonucleótido 8 en una escala de 1 a 15 mmol.

6: $C_5A_2T_{11}$ tioato. ESMS: 5628,3 (encontrado); 5629,6 (calculado).

30 7: $C_5AC_2ACT_2C_4TCTC$ tioato. ESMS: 6438,6 (encontrado); 6440,2 (calculado).

8: $C_5A_2T_{11}$. ESMS: 5355,8 (encontrado); 5356,4 (calculado).

35 Ejemplo 21

Dos etapas de desprotección de oligonucleótido TGCATC₅AG₂C₂AC₂AT (9) con aminas secundarias en un disolvente orgánico seguido amonolisis

40 Se descianoetiló un oligonucleótido unido a un soporte sólido o bien con dietilamina 2 M o bien piperidina 1 M, morfolina o dietilamina en MeCN, dioxano, THF, o DMF tal como se describe en el Ejemplo 20. En esta etapa, pueden usarse igualmente otras aminas, por ejemplo, morfolina, pirrolidina, o dimetilamina.

45 El soporte sólido se trató con amoniaco acuoso concentrado durante 2 horas a temperatura ambiente, la solución se recogió y se mantuvo a 55°C durante 8 horas. Tras la eliminación del disolvente, el residuo se redisolvió en agua y se purificó tal como se describe en el Ejemplo 20.

9: ESMS: 5980,9 (encontrado); 5982,8 (calculado).

50 10: TGCATC₅AG₂C₂AC₂AT tioato. ESMS: 6287,8 (encontrado); 6288,0 (calculado).

Ejemplo 22

55 *Desprotección de oligonucleótidos sintéticos con aminas acuosas*

El procedimiento de desprotección se ejemplifica para el oligonucleótido 10. Se trató un material unido al soporte sólido (20 μmol) con piperidina acuosa 1 M durante 2 horas a temperatura ambiente. En esta etapa, pueden usarse igualmente otras aminas, por ejemplo, morfolina, pirrolidina, dietilamina, dimetilamina, etilamina, o metilamina. El soporte sólido se lavó con otra porción del reactivo de desprotección, y las soluciones combinadas se evaporaron bajo presión reducida. El oligonucleótido 5'-DMTr protegido bruto se disolvió en agua (5 ml) y se purificó mediante HPLC semipreparativa sobre una columna C18 DeltaPak (Waters, 15 mm; 300Å; 25x100 mm), usando NH_4OAc 0,1 M como tampón A, MeCN acuoso al 80% como tampón B, y un gradiente lineal de B de desde 0 hasta 40% en 50 minutos a una velocidad de flujo de 15 ml.min⁻¹. Las fracciones recogidas se evaporaron, el residuo se trató con AcOH acuoso al 80% durante 30 minutos y se evaporó hasta sequedad. El material obtenido se disolvió en DMSO acuoso al 50% y se cargó sobre la misma columna. La columna se lavó con $NaOAc$ acuoso 0,05 M (15 minutos) y agua (15 minutos) a una velocidad de flujo de 15 ml.min⁻¹. La elusión con MeCN acuoso al 60% y evaporación hasta sequedad proporcionó 23,0 g (20%) del oligonucleótido desalado 10 (sal Na⁺). ESMS: 6286,4 (encontrado); 6288,0 (calculado).

ES 2 296 372 T3

Ejemplo 23

Desprotección de oligonucleótidos sintéticos con aminas secundarias acuosas

5 Una vez completada la síntesis del oligonucleótido, se trató un material unido al soporte sólido (20 mmol) con una amina acuosa tal como se describe en el Ejemplo 22. Después de la evaporación de la solución del reactivo de desprotección, el residuo se trató con hidróxido amónico durante 8 horas a 55°C, y se evaporó el disolvente. El producto 6, se aisló y caracterizó tal como se describe en el Ejemplo 22.

10 Ejemplo 24

Desprotección de oligonucleótidos sintéticos con amoníaco en la presencia de resinas aminoalquilo como purificadores de acrilonitrilo. Procedimiento A

15 Una vez completada la síntesis del oligonucleótido, se mezcló un material unido al soporte sólido (20 mmol) con una resina aminoalquilo [por ejemplo, CPG aminoalquilo o tris(2-aminoetil)amina unida a un polímero] y se trató con amoníaco acuoso concentrado durante 2 horas a temperatura ambiente. La fase sólida se separó por filtración, y la desprotección se completó manteniendo la solución a 55°C durante 8 horas. El disolvente se evaporó, y el producto se
20 aisló y caracterizó tal como se describe en el Ejemplo 22.

Ejemplo 25

25 *Desprotección de oligonucleótidos sintéticos con amoníaco en la presencia de resinas aminoalquilo como purificadores de acrilonitrilo. Procedimiento B*

Un material unido al soporte sólido (20 mmol) se trató con un flujo de amoníaco acuoso concentrado durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras abandonar el recipiente de reacción, la solución se pasó a través de una segunda
30 columna que contenía una resina aminoalquilo como en el Ejemplo 24, y se recogió. Opcionalmente, la solución recogida puede reciclarse pasándola nuevamente a través de ambas columnas. Cuando se completó la liberación del oligonucleótido de CPG, la solución de oligonucleótido se recogió y trató tal como se describe en el Ejemplo 24.

35 Ejemplo 26

Desprotección de oligonucleótidos sintéticos con amoníaco en la presencia de mercaptanos como purificadores de acrilonitrilo

40 Un oligonucleótido unido al soporte sólido se trató con amoníaco acuoso concentrado y tiocresol (0,1 M) durante 2 horas a temperatura ambiente, la solución se recogió y mantuvo a 55°C durante 8 horas. Tras la eliminación del disolvente, el residuo se redisolvió en agua y se extrajo dos veces con cloruro de metileno. La capa acuosa se recogió, y el producto, 5, se aisló y se caracterizó tal como se describe en el Ejemplo 20. Igualmente, pueden usarse como purificadores de acrilonitrilo otros tioles, por ejemplo, tiofenol, mercaptoetanol, 1,3-etanoditiol, o etanotiol.

45

Ejemplo 27

50 *Desprotección de oligonucleótidos sintéticos con amoníaco en la presencia de resinas mercaptoalquiladas como purificadores de acrilonitrilo*

Un oligonucleótido unido al soporte sólido se trató como en el Ejemplo 25, pero la segunda columna contenía una resina mercaptoalquilada (por ejemplo, las resinas¹ mercaptoalquiladas informadas anteriormente o resina tiol NovaSyn[®] TG). El producto se aisló y se caracterizó tal como se describe en el Ejemplo 20.

55

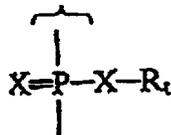
¹ Salo, H; Guzaev, A; Lönnberg, H., *Bioconjugate Chem.*, vol. 9, págs. 365-37, (1998).

60

65

REIVINDICACIONES

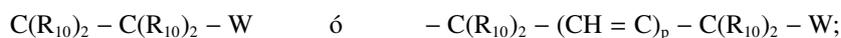
1. Un procedimiento para la desprotección de un oligómero ligado a fosfato, conteniendo dicho oligómero una pluralidad de enlaces fósforo protegidos de fórmula:



en la que:

cada X es O o S;

R_t es un grupo de protección de fósforo de la fórmula:



en la que:

cada R₁₀ es H;

W es un grupo captador de electrones;

p es 1 hasta 3;

que comprende:

(a) proporcionar una muestra que contiene una pluralidad de dichos oligómeros ligados a fosfato;

(b) la puesta en contacto de dichos oligómeros con un reactivo de desprotección durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para eliminar dichos grupos R_t de dichos oligómeros para formar una pluralidad de oligómeros desprotegidos; en el que dicho reactivo de desprotección comprende al menos una amina alifática, teniendo el ácido conjugado de dicha amina un pKa de desde 8 hasta 11; comprendiendo además dicho reactivo de desprotección uno o más disolventes seleccionados entre el grupo constituido por disolventes alquilo, disolventes haloalquilo, disolventes cianoalquilo, disolventes arilo y disolventes aralquilo, siempre y cuando dicho reactivo de desprotección no comprenda un disolvente de base heterocíclica además de dicha amina alifática; y

(c) la reacción de dichos oligómeros desprotegidos con un reactivo de escisión.

2. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende además una etapa de lavado antes de la etapa (c).

3. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichos oligómeros están en solución.

4. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichos oligómeros están ligados a un soporte sólido.

5. El procedimiento de la reivindicación 4 en el que dicho reactivo de desprotección no escinde dichos oligómeros de dicho soporte sólido.

6. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho agente de desprotección comprende un disolvente haloalquilo o un disolvente cianoalquilo.

7. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que dicha amina alifática es trietilamina o piperidina y dicho disolvente es acetonitrilo o cloruro de metileno.

8. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho agente de protección de fósforo es -CH₂-CH₂-C≡N o -CH₂-(CH=CH)_p-CH₂-C≡N, en donde p es un número entero de desde 1 hasta 3.

9. El procedimiento de la reivindicación 8 en el que dicho agente de protección de fósforo es -CH₂-CH₂-C≡N.

10. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho reactivo de desprotección comprende además un purificador, en el que dicho purificador es un mercaptano, un beta amino tiol, una fosfina, un fosfito, un dieno, una urea, una tiourea, una amida, una imida, una imida cíclica, una cetona, un polímero que tiene grupos tioles libres, o un polímero que tiene grupos amino libres.

ES 2 296 372 T3

11. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho reactivo de escisión comprende además un purificador, en el que dicho purificador es tal como se ha definido en la reivindicación 10.

12. El procedimiento de la reivindicación 10 ó 11 en el que dicho purificador es un alquilmcaptano, resina tiol 4-metoxitritilo, resina tiol 2-clorocritilo, etileno glicol, etileno glicol substituido, 1-butanotiol, hidrocloreuro de S-(2-amino-4-tiazolilmetil)-isotiourea, 2-mercaptoetanol, 3,4-diclorobencilamina, bencilamina, bencilamina en presencia de disulfuro de carbono, hidroxilamina, 2-fenilindol, n-butilamina, éster dietílico de ácido acetaminomalónico, éster etílico de N-acetil-2-cianoglicina, 3-fenil-4-(o-fluorofenil)-2-butanona, 3,4-difenil-2-butanona, desoxibenzoina, N-metoxiftalimida, cloruro de p-sulfobencenodiazonio, cloruro de p-sulfamidobencenodiazonio, o una resina amina unida a un polímero en el que la amina está seleccionada entre bencilamina, etilenodiamina, dietilamina triamina, tris-(2-aminoetil)amina, metilamina, metilguanidina, polilisina, oligolisina, Agropore™ NH₂HL y Agropore™ NH₂LL.

13. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho reactivo de escisión comprende una solución metanólica acuosa de un carbonato de metal del Grupo I o del Grupo II.

14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que dicho reactivo de escisión es CaCO₃ metanólico acuoso.

15. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho reactivo de escisión comprende un hidróxido de metal acuoso.

16. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho reactivo de escisión comprende un catalizador de transferencia de fase, en el que dicho catalizador de transferencia de fase es una sal de amonio cuaternario, sal de fosfonio cuaternario, éter corona, t-Bu₄N⁺OH, o t-Bu₄N⁺F⁻.

17. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho reactivo de escisión comprende NaNH₂.

18. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichos oligómeros desprotegidos tienen desde 0,001% hasta 1% de aducto de acrilonitrilo.

19. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichos oligómeros desprotegidos tienen desde 0,1% hasta 1% de aducto de acrilonitrilo.

20. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichos oligómeros desprotegidos tienen desde 0,1% hasta 0,75% de aducto de acrilonitrilo.

21. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichos oligómeros desprotegidos tienen desde 0,1% hasta 0,5% de aducto de acrilonitrilo.

22. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichos oligómeros desprotegidos están libres de aducto de acrilonitrilo detectable.

23. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que las etapas b) y c) se llevan a cabo simultáneamente.

24. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha amina alifática es trietilamina o piperidina; dicho disolvente es acetonitrilo o cloruro de metileno; y dicho grupo de protección de fósforo es -CH₂-CH₂-C≡N.

25. El procedimiento de la reivindicación 24 en el que dicho reactivo de desprotección comprende además un purificador, en el que dicho purificador es tal como se ha definido en la reivindicación 10.

26. El procedimiento de la reivindicación 24 en el que dicho reactivo de escisión comprende además un purificador, en el que dicho purificador es tal como se ha definido en la reivindicación 10.

27. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicho reactivo de desprotección comprende una alquil amina secundaria, y dicho reactivo de escisión comprende un carbonato de metal alcalino.

28. El procedimiento de la reivindicación 27 en el que dicha amina es piperidina, dicho carbonato de metal alcalino es carbonato potásico.