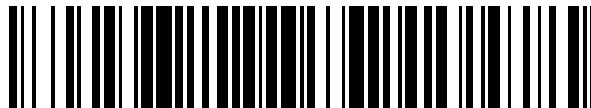


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 363**

51 Int. Cl.:

C07F 9/24 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007 E 07857038 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2097427**

54 Título: **Compuestos y métodos para la síntesis y purificación de oligonucleótidos**

30 Prioridad:

22.12.2006 US 871733 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.03.2013

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**GUPTA, AMAR P. y
WILL, STEPHEN G.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 399 363 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

Compuestos y métodos para la síntesis y purificación de oligonucleótidos

5 Campo de la invención

10 Generalmente, la invención hace referencia a la química de los ácidos nucleicos y a la biología molecular. Más específicamente, la invención proporciona métodos de síntesis y purificación de ácidos nucleicos además de los reactivos de protección química, así como composiciones, kits y sistemas que incluyen tales reactivos. La invención puede utilizarse para varios propósitos industriales, médicos y forenses.

Antecedentes de la invención

15 La invención hace referencia a los compuestos y métodos para la síntesis y purificación de oligonucleótidos, y más específicamente, a compuestos y métodos para la síntesis, protección química y purificación de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos tienen una gran importancia en el mundo de los seres vivos ya que son transportadores y transmisores de la de información genética. Desde su descubrimiento por F. Miescher han despertado un amplio interés científico que ha llevado al descubrimiento de su función, estructura y mecanismo de acción. A menudo, las variaciones en la secuencia de los ácidos nucleicos son responsables de las diferencias en la susceptibilidad a enfermedades y las respuestas farmacológicas a un tratamiento. Para ilustrar esto, los cambios en una sola base de una molécula de ácido nucleico, a los que se les llama polimorfismos de nucleótido simples (SNP), pueden afectar al riesgo de un individuo de contraer una enfermedad concreta. Mediante la comparación de estas variaciones, los investigadores han logrado el entendimiento de la utilidad médica de los SNP, potenciando así nuestra capacidad para diagnosticar, pronosticar y tratar enfermedades de forma efectiva. Además, se utilizan nucleótidos sintéticos purificados para la amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otros métodos de amplificación; como cebadores; sondas de hibridación para la detección y/o secuenciación, terapia génica, clonación, estudios de mutagénesis específicos de *locus* y similares. La calidad de los resultados de estas técnicas está directamente relacionada con la pureza de los oligonucleótidos utilizados.

20 Como tal, la pureza de una molécula de ácido nucleico es crucial para elucidar la función y facilitar la manipulación de estas moléculas. La síntesis en fase sólida automatizada es el enfoque más común para la producción de oligonucleótidos cortos. Habitualmente, estos métodos sintéticos se basan en reacciones paso a paso de derivados de fosoramidita o H-fosfonato de nucleósidos para formar enlaces continuos de estos bloques de construcción monoméricos en un orden predeterminado (véase por ejemplo, T. Brown & D. J. S. Brown en *Oligonucleotides and Analogues--A Practical Approach*, (1991) (Eckstein, F., publ. IRL Press en Oxford University Press, Oxford, N.Y., Tokyo); Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; *Oligonucleotides Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds., 1984); *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Beaucage, S. L.; Bergstrom, D. E.; Glick, G. D.; Jones, R. A., Eds., John Wiley & Sons, Inc.: Nueva York, Capítulos 1-4, 2000-2004; y un serie, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.). No obstante, los oligonucleótidos resultantes son mezclas heterogéneas de secuencias, lo que complica la purificación y limita la medida en la que se pueden elaborar los oligonucleótidos, así como el rendimiento resultante. El problema de la purificación aumenta en relación al aumento de la longitud de la cadena. Habitualmente, los grupos 5'-hidroxilo que no han reaccionado se protegen químicamente con anhídrido acético para prevenir la elongación futura de la cadena con una secuencia "fallida" incorrecta. Las patentes US 2002/055623 y US 4816571 describen la utilización de anhídrido acético y fosfito monoéster como reactivos protectores para proteger las secuencias fallidas de oligonucleótidos. No obstante, ninguno de los documentos describe la utilización de reactivos protectores que contienen perfluoroalquilo para proteger las secuencias fallidas de oligonucleótidos, lo que resulta en la formación de secuencias fallidas protegidas que pueden separarse del oligonucleótido diana utilizando la purificación de afinidad fluorosa. Otro método, que puede realizarse en paralelo, es la llamada purificación en tritilo (TOP), que utiliza la liofilicidad de los grupos protectores de tritilo. La secuencia deseada que incluye el grupo protector de tritilo se retiene en un material de soporte lipofílico mientras se sustraen las secuencias fallidas que no tienen el grupo tritilo. Tras la escisión del grupo tritilo bajo condiciones acídicas, se puede eludir el producto de la secuencia deseada del soporte lipofílico.

55 Se utilizan varios métodos para la purificación de oligonucleótidos – la cromatografía de fase reversa mencionada con anterioridad, la cromatografía de intercambio aniónico (AX), la electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE), la precipitación de etanol, o una combinación de estas técnicas.

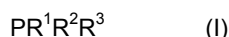
60 No obstante, estos métodos tienen la desventaja de que tanto los grupos acilo como los tritilo son relativamente lábiles a las condiciones empleadas en la síntesis de oligonucleótidos (por ejemplo, las condiciones típicas de desprotección de los oligonucleótidos incluyen la incubación en amonio acuoso a 55-60 °C durante 16 horas), lo que resulta en una purificación pobre o en rendimientos bajos. Estos métodos también están limitados porque las interacciones hidrofóbicas no son particularmente fuertes, por lo que la eficiencia del aislamiento disminuye rápidamente con el aumento de la longitud de la cadena. Consecuentemente, estos métodos están limitados a producir nucleótidos de menos de 100 nucleótidos con rendimientos bajos para la secuencia deseada.

Las estrategias de afinidad fluorosa se han utilizado para la purificación de péptidos (véase Filippov et al. *Tetrahedron Lett.* 2002, 43: 7809-7812; de Visser et al; *Tetrahedron Lett* 2003 44: 9013-9016; Montanari et al. *J Am. Chem. Soc.* 2004, 126: 9528; Brittain et al. *Nature Biotechnol.* 2005 23: 463-468; Markowicz et al. *Synthesis* 2004 80-86; Mizuno et al. *Chem. Lett* 2005 34: 426-427), oligosacáridos (vease Palmacci et al. *Angew. Chem. Int. Ed* 2001, 40: 4433; Manzoni *Chem. Commun.* 2003, 2930-2931 y Goto et al *Synlett* 2004, 2221-2223). Las estrategias de afinidad fluorosa también se han utilizado para la purificación de oligonucleótidos (véase Pearson et al. *J. Org. Chem.* 2005 70: 7114-7122; Beller *Helv. Chim. Acta* 2005, 88: 171-179; Berry et al. WO 2006/081035, Publicación de patente de EE.UU. N° 2006/0178507) pese a que estos informes sólo describen la utilización de grupos tritilo fluorosos. Tal y como se menciona con anterioridad, habitualmente los grupos protectores de acetato y tritilo no sobreviven a las condiciones de desprotección que típicamente se emplean en la síntesis de oligonucleótidos. Además, Berry *et al.* utiliza DMTr fluoroso para marcar el material de longitud completa. Sus materiales purificados- fluorosos son una distribución del producto de longitud completa más la deleción esperada de oligonucleótidos (es decir, n-1, n-2, etc.), dado que el acoplamiento final de la fosforamidita añadió un nucleótido protegido-fluoroso a la distribución preexistente de la cadena deseada más los materiales de deleción, que no puede resolverse mediante HPLC, pero que puede detectarse mediante el análisis de electroforesis capilar.

La presente invención soluciona estos problemas mediante la provisión de un protector de afinidad fluoroso basado en fósforo para proteger las secuencias fallidas, un método que puede utilizarse independientemente del nucleósido utilizado. El método utiliza una combinación de protección fluorosa y cromatografía por afinidad fluorosa que resulta en mayores rendimientos y purezas de oligonucleótidos no protegidos que no poseen las secuencias fallidas, incluso con oligómeros largos (>15meros).

Breve resumen de la invención

El objetivo anterior se logra mediante compuestos de protección con la fórmula (I):



En el que R¹ se selecciona a partir del grupo que consiste en alquiloxi C₁-C₈-, alqueniiloxi C₂-C₈- y alquiniiloxi C₂-C₈-, opcionalmente sustituido con CN;

R² es un halógeno o NR⁴₂;

R³ tiene la fórmula – L-A;

cada R⁴ es un alquilo C₁-C₆ o está combinado para formar un anillo heterocíclico de 4 a 7 miembros, opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆-, haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆-, arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcoxycarbonilo C₁-C₆;

L es un alquilenoxi C₁-C₁₀-, que se sustituye opcionalmente con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆-, haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆-, arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcoxycarbonilo C₁-C₆-, y

A es un perfluoroalquilo C₁-C₃₀;

y en el que un grupo alquilo hace referencia a una porción de hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico.

con la condición que se excluya el compuesto con la fórmula PR¹R²R³, en el que R¹ es -OCH₂CH₂CN, R² es -N(i-Pr)₂ y R³ es -OCH₂CF₃, y el compuesto con la fórmula PR¹R²R³ en el que R¹ es -O-terc-butilo, R² es -N(Et)₂ y R³ es -OCOCF₃.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la inhibición de la extensión de un oligonucleótido que incluye la puesta en contacto de un oligonucleótido con un compuesto con o sin un catalizador, y dicho compuesto tiene la fórmula (I):



En el que R¹ se selecciona a partir del grupo que consiste en alquiloxi C₁-C₈-, alqueniiloxi C₂-C₈- y alquiniiloxi C₂-C₈-, opcionalmente sustituido con CN;

R² es un halógeno o NR⁴₂;

R³ tiene la fórmula – L-A;

cada R⁴ es un alquilo C₁-C₆ o está combinado para formar un anillo heterocíclico de 4 a 7 miembros, opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆-,

haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆-, arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcocarbonilo C₁-C₆;

L es un alquilenoxi C₁-C₁₀-, que se sustituye opcionalmente con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆-, haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆-, arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcocarbonilo C₁-C₆-; y

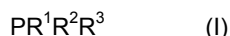
A es un perfluoroalquilo C₁-C₃₀;

y en el que un grupo alquilo hace referencia a una porción de hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico.

En una realización, la presente invención proporciona un método de preparación de un oligonucleótido modificado que incluye X nucleótidos donde X es un número entero mayor que 3; el método incluye

(a) la puesta en contacto de varios oligonucleótidos, y cada uno incluye X-n unidades de nucleótido, con un nucleótido o nucleósido modificado, donde n es un número entero de 1 a X-1; y

(b) la puesta en contacto del producto no reaccionado de (a) con un reactivo protector que incluye un compuesto con la fórmula (I):



En el que R¹ se selecciona a partir del grupo que consiste en alquiloxi C₁-C₈-, alquileniloxi C₂-C₈- y alquinoxiloxi C₂-C₈-, opcionalmente sustituido con CN;

R² es un halógeno o NR⁴₂;

R³ tiene la fórmula – L-A;

cada R⁴ es un alquilo C₁-C₆ o está combinado para formar un anillo heterocíclico de 4 a 7 miembros, opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆-, haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆-, arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcocarbonilo C₁-C₆;

L es un alquilenoxi C₁-C₁₀-, que se sustituye opcionalmente con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆-, haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆-, arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcocarbonilo C₁-C₆-; y

A es un perfluoroalquilo C₁-C₃₀;

y donde un grupo alquilo hace referencia a una porción de hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico.

También se describe un método de preparación de un oligonucleótido que contiene X unidades monoméricas donde X es un número entero mayor que 3; el método incluye

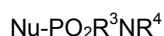
(a) la puesta en contacto de varios oligómeros, y cada uno incluye X-n unidades monoméricas con un monómero, donde n es un número entero de 1 a X-1;

(b) la puesta en contacto del producto no reaccionado de (a) con un reactivo protector que incluye un compuesto con la fórmula (I); y

(c) la separación del oligómero no protegido del resto del producto de (b) mediante cromatografía por afinidad fluorosa.

También se describe un oligonucleótido modificado que incluye grupos perfluoroalquilo producido mediante la utilización de los métodos de la presente invención.

También se describe un oligonucleótido que incluye al menos una porción nucleósido modificada con la fórmula:



En el que Nu es un nucleósido;

R³ tiene la fórmula – L-A;

cada R⁴ es un alquilo C₁-C₆ o está combinado para formar un anillo heterocíclico de 4 a 7 miembros, opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆-, haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆-, arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcocarbonilo C₁-C₆;

L es un alquilenoxi C₁-C₁₀-, que se sustituye opcionalmente con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆ -, haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆-, arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcóxicarbonilo C₁-C₆-;

5

A es un perfluoroalquilo C₁-C₃₀; y

~ indica el punto de adhesión al oxígeno del hidroxilo del nucleósido;

10 y en el que un grupo alquilo hace referencia a una porción de hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico.

Aún en otra realización, la presente invención también proporciona composiciones, kits y sistemas que incluyen los oligonucleótidos y reactivos protectores de la presente invención.

15 Las características anteriores y otras características de la presente invención se comprenderán mejor con las referencias a la siguiente descripción y de las ilustraciones que las acompañan.

Breve descripción de las ilustraciones

20 La figura 1 muestra el ciclo de la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida.

La figura 2 muestra la escisión del oligonucleótido del soporte sólido.

25

La figura 3 muestra la síntesis de un reactivo protector fluoroso de fosforamidita.

La figura 4 ilustra la purificación por afinidad fluorosa.

30

La figura 5 muestra un análisis mediante HPLC de T-15 con protector fluoroso, que presenta secuencias fallidas.

La figura 6 muestra un análisis mediante HPLC del producto filtrado a través de un cartucho fluoroso FLUORO-PAK™.

35

La figura 7 muestra un análisis mediante HPLC de las impurezas liberadas de la columna tras la filtración a través de un cartucho fluoroso mediante el lavado de la columna con acetonitrilo al 40% en 0,1 M TEAA.

La figura 8 muestra un análisis mediante HPLC del filtrado tras un paso de desalación con NAP-10.

Descripción detallada de la invención

40

I. Definiciones

Antes de describir la presente invención en detalle, debe comprenderse que esta invención no se limita a unas composiciones o métodos particulares, que, por supuesto, pueden variar. También debe comprenderse que la terminología utilizada aquí pretende clarificar solamente la descripción de realizaciones particulares, y no tiene la intención de ser limitante. Además, a menos que se defina de manera contraria, todos los términos técnicos y científicos utilizados tienen el mismo significado que el que normalmente entienden los expertos en la materia a la que esta invención pertenece. En la descripción y reivindicación de la presente invención, se utilizarán las siguientes variantes terminológicas y gramaticales de acuerdo con las definiciones que se dan a continuación.

50

El término "un", "uno" o "una" hace referencia a uno o más; por ejemplo, un polímero hace referencia a uno o más polímeros. Como tal, los términos "un", "uno" o "una" se usan indistintamente aquí.

55

Tal y como se utilizan aquí, los términos "incluye," "incluyendo," "comprende," "comprendiendo," "tiene", "teniendo" o cualquier otra variación de los mismos, tienen el significado de cubrir una inclusión no exclusiva. Por ejemplo, un proceso, método, artículo, o aparato que incluye una lista de elementos no está limitado necesariamente sólo a esos elementos, y puede incluir otros elementos que no estén enumerados expresamente o que sean inherentes a tal proceso, método, artículo, o aparato. Además, a menos que se exprese lo contrario, "o" hace referencia a un "o" inclusivo y no a un "o" exclusivo. Por ejemplo, una condición A o B se satisface con cualquiera de los siguientes: A es verdadero (o está presente) y B es falso (o no está presente), A es falso (o no está presente) y B es verdadero (o está presente), y tanto A como B son verdaderos (o están presentes).

60

Un "grupo alquilo" hace referencia a una porción de hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico e incluye todos los isómeros posicionales, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, pentilo, 1- metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-

65

dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo y 1-etil-2-metilpropilo, n-hexilo, ciclohexilo, n-heptilo, n-octilo, 2-etilhexilo, n-nonilo, n-decilo y similares. Habitualmente, un grupo alquilo incluye unos 1-20 átomos de carbono y, más habitualmente, unos 2-15 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar sustituidos o no.

5 Tal y como se utiliza aquí, se contempla que el término "sustituido" incluye todos los sustituyentes permisibles de los compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Algunos sustituyentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, los descritos más abajo. Los sustituyentes pueden ser varios grupos e incluyen, por ejemplo, R', -halógeno, -OR', -NR'R", -SR', -SiR'R"R", -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R", -NR'C(O)₂R', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R", -NR'S(O)₂R", -CN y -NO₂ en un número que va de cero a (2 m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. R', R" y R"' hacen referencia de manera independiente a un hidrógeno, grupos alquilo C₁₋₈ no sustituidos, heteroalquilo no sustituidos o no sustituidos, alquilo C₁₋₈ no sustituidos, alcoxi C₁₋₈ o toalcoxi C₁₋₈, o grupos arilalquilo C₁₋₄ no sustituidos. Cuando R' y R" se adhieren al mismo átomo de nitrógeno pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 3, 4, 5, 6, o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R" pretende incluir a 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. El término "acilo", por sí sólo o como parte de otro grupo, hace referencia a un radical alquilo en el que se reemplazan dos sustituyentes del carbono más cercano al punto de adhesión del radical por el sustituyente =O (por ejemplo, -C(O)CH₃, -C(O)CH₂CH₂OR' y similares). Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más de uno, así como el mismo o diferentes para el compuesto orgánico apropiado. Para los propósitos de esta invención, los heteroátomos tales como el nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquiera de los sustituyentes permisibles de los compuestos orgánicos descritos aquí que satisfagan las valencias de los heteroátomos. Esta invención no tiene la intención de limitarse de ninguna manera por los sustituyentes permisibles de los compuestos orgánicos.

25 Los términos "alcoxilo" o "alcoxi", tal y como se utilizan aquí, hacen referencia a un grupo alquilo, tal y como se define con anterioridad, que tiene un radical de oxígeno unido al mismo. Algunos grupos alcoxilo representativos incluyen metoxi, etoxi, propiloxi, terbutoxi y similares. Un "éter" es la unión covalente de dos hidrocarburos mediante un oxígeno. De acuerdo con esto, el sustituyente de un alquilo que convierte a tal alquilo en un éter es o se parece a un alcoxilo, tal como puede representarse por -O-alquilo, -O-alqueno, -O-alquino y similares.

30 Un "grupo alquenileno" hace referencia a un grupo alquenileno que incluye un átomo de oxígeno e incluye, por ejemplo, aliloxi, y similares.

35 Un "grupo alquinileno" hace referencia a un grupo alquinileno que incluye un átomo de oxígeno e incluye, por ejemplo, propargiloxi, y similares.

40 El término "arilalcoxi" hace referencia a un radical arilo unido directamente a un grupo alcoxi. Por razones de brevedad, el arilo que forma parte del término combinado anterior incluye también el heteroarilo.

45 Un "grupo alcohol" hace referencia a un grupo orgánico que incluye al menos un grupo hidroxilo.

Un "grupo halógeno" hace referencia a un grupo que incluye un átomo halógeno, tal como F, Cl, Br, o I.

50 "Haloalquilo" hace referencia a un grupo alquilo, tal y como se define aquí, en el que uno o más átomos de hidrógeno se han sustituido por halógenos, incluyendo perhaloalquilos, tales como el trifluorometilo.

Un "heterooligo" hace referencia a un oligómero que incluye dos o más residuos de monómero diferentes.

55 La oración "grupo protector", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a sustituyentes que protegen a un grupo funcional potencialmente reactivo de transformaciones químicas no deseadas. Algunos ejemplos de tales grupos protectores incluyen ésteres de ácido carboxílico, sililéteres de alcoholes, y acetales y cetales de aldehídos y cetonas, respectivamente. El campo de la química de los grupos protectores se ha revisado (Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. Protective Groups in Organic Synthesis, supl. 2 ed.; Wiley: Nueva York, 1991). Las siguientes abreviaturas hacen referencia a los grupos protectores indicados. "Tr" hace referencia al compuesto Ph₃C, también conocido como trifenilmetilo, también conocido como tritilo. "MMTr" hace referencia al compuesto (4-CH₃OPh)C(Ph)₂, también conocido como monometoxitritilo. "DMTr" hace referencia al compuesto (4-CH₃OPh)₂CPh, también conocido como dimetoxitritilo. "TBDMS" hace referencia al compuesto t-butildimetilsililo. "TES" hace referencia al compuesto trietilsililo. "TIPS" hace referencia al compuesto triisopropilsililo. "Boc" hace referencia al compuesto (CH₃)₃CO₂C, también conocido como t-butiloxicarbonilo. "Cbz" hace referencia al compuesto PhCH₂O₂C, también conocido como benziloxicarbonilo. "Piv" hace referencia al compuesto (CH₃)₃CO, también conocido como pivaloilo.

60 El término "varios" hace referencia a más de uno; por ejemplo, varios polímeros hacen referencia a dos o más polímeros.

Tal y como se utilizan aquí, los términos "oligómeros" y "polímeros" generalmente hacen referencia a moléculas creadas mediante la unión de unidades repetidas de una o más moléculas pequeñas llamadas monómeros. Generalmente, los oligómeros incluyen menos unidades monoméricas que los polímeros, aunque el límite preciso entre un oligómero y un polímero no está bien definido y, para los fines de esta invención, los términos se utilizan indistintamente para abarcar el ámbito completo de ambos términos: los oligómeros pueden tener números diferentes de unidades repetidas. Los oligómeros pueden estar unidos a marcadores o trazadores.

Una "secuencia" de un ácido nucleico hace referencia al orden e identidad de nucleótidos en el ácido nucleico. Habitualmente, una secuencia se lee en dirección 5'-3'.

El término "monómero" hace referencia a un compuesto que puede polimerizarse. El término "unidad monomérica" hace referencia a unidades que se repiten en un polímero.

El término "ácido nucleico" hace referencia a nucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, didesoxinucleótidos, etc.) y polímeros (por ejemplo, "oligonucleótidos") que incluyen ácidos desoxirribonucleicos (DNA), ácidos ribonucleicos (RNA), híbridos de DNA-RNA, oligonucleótidos, polinucleótidos, genes, cDNAs, aptámeros, ácidos nucleicos de sentido reverso, RNA de interferencia (RNAi), balizas moleculares, sondas de ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), conjugados de PNA-DNA, conjugados de PNA-RNA, etc. que incluyen a tales nucleótidos unidos entre sí covalentemente, ya sea de forma lineal o ramificada. Habitualmente, un oligonucleótido es mono o bicatenario y, generalmente, contendrá uniones de fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se remarca aquí, los análogos de los ácidos nucleicos incluidos pueden tener una estructura alternativa, incluyendo, por ejemplo y sin limitarse a, la fosforamida (Beaucage et al. (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925) y las referencias en el mismo; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81:579; Letsinger et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 3487; Sawai et al. (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; y Pauwels et al. (1986) *Chemica Scripta* 26: 1419, fosforotioato (Mag et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; y la patente de EE.UU. N° 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321), enlaces de O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press (1992)), y estructuras y enlaces de ácidos nucleicos peptídicos (véase, Egholm (1992) *J Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier et al. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008; Nielsen (1993) *Nature* 365:566; Carlsson et al. (1996) *Nature* 380:207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen los que poseen una estructura cargada positivamente (Denpcy et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92: 6097); estructuras no iónicas (Patentes de EE.UU. N° 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; *Angew (1991) Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger et al. (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; Capítulos 2 y 3, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"*, Ed. Y. S. Sanghvi y P. Dan Cook; Mesmaeker et al. (1994) *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs et al. (1994) *J Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y estructuras sin ribosa, que incluyen las descritas en la patentes de EE.UU. N° 5.235.033 y 5.034.506, y los capítulos 6 y 7, *ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y. S. Sanghvi y P. Dan Cook. También se incluyen en la definición de ácido nucleico los ácidos nucleicos que contienen uno o más glúcidos carbocíclicos (véase Jenkins et al. (1995) *Chem. Soc. Rev.* pp. 169-176). También se describen varios análogos de ácidos nucleicos en, por ejemplo, Rawls, *C & E News*, 2 de Junio, 1997, página 35. Estas modificaciones de la estructura de ribosa-fosfato pueden estar hechas para facilitar la adición de porciones adicionales tales como marcadores, o para alterar la estabilidad y la semivida de tales moléculas en ambientes fisiológicos. Además de las bases heterocíclicas naturales que habitualmente se encuentran en los ácidos nucleicos (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), los análogos de los ácidos nucleicos también incluyen aquellos que tienen bases heterocíclicas no naturales. En particular, se describen muchas bases no naturales en, por ejemplo Seela et al. (1991) *Helv. Chim. Acta* 74:1790, Grein et al. (1994) *Bioorg. Med Chem. Lett.* 4:971-976, y Seela et al. (1999) *Helv. Chim. Acta* 82:1640. Para una ilustración adicional, de manera opcional se incluyen ciertas bases utilizadas en los nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de fusión (Tm). Por ejemplo, algunas de estas incluyen 7-desazapurinas (por ejemplo, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo, propinil-dU, propinil-dC, etc.), y similares. Véase, por ejemplo, Seela et al. Patente de EE.UU. N° 5.990.303. Otras bases heterocíclicas representativas incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina; derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-desaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitosina; 5-fluorocitosina; 5-clorocitosina; 5-yodocitosina; 5-bromocitosina; 5-metilcitosina; 5-propinilcitosina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracil, y similares.

Un "nucleósido" hace referencia a un componente del ácido nucleico que incluye una base o grupo básico (por ejemplo, incluye al menos un anillo homocíclico, al menos un anillo heterocíclico, al menos un grupo arilo, y/o similares) unido covalentemente a una porción glucídica (por ejemplo, un glúcido ribosa, etc.), un derivado de una porción glucídica, o un equivalente funcional de una porción glucídica (por ejemplo, un análogo, tal como un anillo carbocíclico). Por ejemplo, cuando un nucleósido incluye una porción glucídica, la base está habitualmente unida a una posición 1' de una porción glucídica. Tal y como se describe anteriormente, una base puede ser de origen natural (por ejemplo, una base purínica, tal como la adenina (A) o la guanina (G), una base pirimidínica, tal como la timina (T), la citosina (C), o el uracilo (U)), o de origen no natural (por ejemplo, una base de 7-desazapurina, una base de pirazolo[3,4-d]pirimidina, una base de propinil-dN, etc.). Algunos ejemplos de nucleósidos incluyen ribonucleósidos,

desoxirribonucleósidos, didesoxirribonucleósidos, nucleósidos carbocíclicos, etc.

Un "nucleótido" hace referencia a un éster de un nucleósido, por ejemplo, un éster fosfato de un nucleósido. Por ejemplo, un nucleótido puede incluir 1, 2, 3, o más grupos fosfato unidos covalentemente a una posición 5' de una porción glucídica del nucleósido.

Un "oligonucleótido" hace referencia a un ácido nucleico que incluye, al menos, dos nucleótidos, habitualmente más de tres nucleótidos, y normalmente más de diez nucleótidos. Generalmente, el tamaño exacto de un oligonucleótido depende de varios factores, incluyendo la función definitiva o la utilización del oligonucleótido. Tal y como se utiliza aquí, el término "oligonucleótido" hace referencia a una cadena simple de nucleótidos o a las modificaciones químicas de la misma, tal como, por ejemplo, nucleótidos con un puente de 2'O-4'C-metileno en su porción glucídica, que son los nucleótidos que configuran los ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, las que proporcionan otros grupos químicos que incorporan una carga adicional, polarizabilidad, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y funcionalidad a los nucleótidos concretos o a sus bases correspondientes, o al oligonucleótido al completo. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, bases modificadas, tales como modificaciones en la posición 2' del glúcido, modificaciones en la posición 5 de la pirimidina, modificaciones en la posición 8 de la purina, modificaciones en la citosina de las aminas exocíclicas, sustitución del 5-bromo-uracilo; modificaciones de la estructura, metilaciones, bases que pueden formar parte de combinaciones de bases no habituales, tales como las isobases isocitidina y isoguanidina, y similares. Otras modificaciones incluyen la adhesión de marcadores y moléculas marcadoras tales como tintes fluorescentes, biotina, aglutinantes de surco menor y similares conocidos por los expertos en la materia. Además, las modificaciones incluyen estructuras modificadas de los oligonucleótidos, y algunos ejemplos son los ácidos nucleicos peptídicos (PNA), fosforotioato de DNA, metilfosfonato de DNA y otras modificaciones conocidas por los expertos en la materia, tal como se revisó por Micklefield (2001) Current Medicinal Chemistry 8:1157-1179. Los oligonucleótidos, tal y como se hace referencia en esta invención, pueden consistir en cualquiera de las combinaciones de nucleótidos y sus modificaciones descritas con anterioridad y que pueden tener unos pocos nucleótidos, por ejemplo, hasta 20, o muchos, por ejemplo, desde 20 hasta varios cientos o más, incorporados en la cadena, y el número total de nucleótidos se denota como n en el contexto de esta invención.

Los términos "secuencia fallida", "polímero contaminante" y "derivados contaminantes" se utilizan indistintamente para hacer referencia a los polímeros formados durante la síntesis del polímero que no están formados por el número deseado y/o la secuencia deseada de monómeros. Por consiguiente, estos representan impurezas de los polímeros sintetizados. Habitualmente, las secuencias fallidas están protegidas en la síntesis del polímero y, de este modo se convierten en secuencias truncadas. Las secuencias fallidas incluyen derivados contaminantes, tal y como se definen aquí, con longitudes de cadena de entre 1 y X-1, en el que X es un número entero de, al menos, 3.

"Protección" y "paso de protección", tal y como se utilizan aquí hacen referencia a la reacción del grupo hidroxilo libre, o cualquier otro grupo funcional adecuado para la extensión de la cadena de un polímero, por ejemplo, una cadena de oligonucleótido, con un reactivo protector durante la síntesis del polímero en fase sólida para producir la cadena que no puede participar en los pasos de acoplamiento subsiguientes. Para la síntesis de los oligonucleótidos, la protección puede llevarse a cabo sobre el grupo funcional 5' de un oligonucleótido extendido de 3' a 5' o en el grupo funcional 3' de un oligonucleótido extendido de 5' a 3'. Los pasos de protección se llevan a cabo entre los pasos de acoplamiento de la síntesis del polímero en fase sólida y el siguiente paso de desprotección. Los reactivos protectores de las realizaciones de esta invención incluyen los grupos funcionales que permiten la sustracción post-síntesis de los polímeros contaminantes, tal y como se define más adelante.

Tal y como se utiliza aquí, los términos "protector" o "grupo protector" hace referencia al grupo químico que se introduce en una secuencia fallida durante un paso de protección en la síntesis del polímero que previene de la extensión de un polímero, por ejemplo, el ácido nucleico al cual está unido. Para ilustrar esto, los grupos bloqueadores de la fosforamidita en las posiciones 5' de los nucleótidos de la invención incluyen grupos fluorosos. Más adelante, también se describen grupos protectores y monómeros protegidos representativos.

La "afinidad" hace referencia a la asociación de un polímero contaminante a una fase sólida, denominado "soporte de afinidad". El término "afinidad", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una fase sólida que deriva con una porción capaz de formar una asociación fuerte con un grupo funcional correspondiente, introducido en el polímero contaminante mediante protección. En el caso de la cromatografía por afinidad fluorosa, la fase sólida puede derivarse con porciones fluorosas. Dichas derivaciones se logran mediante la adhesión de dichas porciones a los grupos funcionales en la fase sólida. Estos grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, polifluoroalcanes y similares.

Una "fase sólida", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una resina, membrana o polímero insoluble en el medio empleado en una reacción particular o unidad de operación realizada para sintetizar o purificar polímeros de la invención. Una fase sólida puede ser de naturaleza inorgánica, incluyendo, pero sin limitarse a, óxidos inorgánicos tales como el sílice, la alúmina, las zeolitas y los vidrios de poro controlado (CPG); o de naturaleza orgánica, incluyendo, pero sin limitarse a, poliestireno-divinilbenceno, poli(acrilamida), polimetacrilato, polivinilalcohol, otros polímeros sintéticos, carbohidratos tales como la celulosa y almidón u otros carbohidratos poliméricos, u otros polímeros orgánicos y cualquier copolímero, material compuesto o combinación de los materiales inorgánicos u

orgánicos anteriores. Además, una fase sólida puede estar formada por un polímero soluble que puede forzarse a experimentar una transición de fase, por ejemplo, el polietilenglicol y los derivados del mismo, tal y como se describe, por ejemplo, en Bayer et al. (1972) Nature 237: 512-513.

5 "Extendido" hace referencia a un polímero, por ejemplo, un ácido nucleico al que se han unido o incorporado de otra forma (por ejemplo, mediante enlace covalente) uno o más monómeros adicionales, por ejemplo, nucleótidos. Los ácidos nucleicos están "extendidos" o "elongados" cuando se incorporan nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, pueden extenderse con un nucleótido que incorpora un biocatalizador, como una polimerasa que habitualmente añade nucleótidos en el extremo 3' terminal de un ácido nucleico. Un ácido nucleico también puede extenderse mediante una reacción química, por ejemplo, una reacción de síntesis de DNA.

10 "Extensible" hace referencia a un polímero, por ejemplo, un oligo- o polinucleótido al que se puede añadir o unir covalentemente al menos otro monómero, por ejemplo, un nucleótido, por ejemplo, en una reacción de síntesis de DNA o en una reacción catalizada por un biocatalizador que incorpora monómeros.

15 "No extensible" hace referencia a un polímero, por ejemplo, un oligo- o polinucleótido que está bloqueado en relación a su extensión adicional, es decir, que no se pueden añadir o enlazar covalentemente más nucleótidos, por ejemplo, en una reacción de síntesis de DNA o una reacción catalizada por un biocatalizador que incorpora monómeros.

20 El término "protegido" hace referencia a una característica de un monómero u oligómero, por ejemplo, un nucleótido u oligonucleótido que incluye un grupo protector. Para los nucleótidos, esto ocurre habitualmente en la posición 5' o la posición 3' de la porción glucídica del nucleótido.

25 Habitualmente, el término "lipofílico/a" o "lipofilidad" hace referencia a la tendencia a asociarse de los grupos hidrocarburos, en base al incremento de entropía del disolvente en el que se encuentran. Este efecto es especialmente pronunciado en el agua, donde esta reacción se denomina "hidrofóbica".

30 El término "fluoroso/a" hace referencia a una porción orgánica altamente fluorada. Las porciones pueden ser grupos perfluoroalquilo C₁-C₃₀ lineales o ramificados. El término relacionado "asa de afinidad fluorosa/de perfluoroalquilo" se emplea aquí para hacer referencia a un ligando de un reactivo protector que incluye uno o más grupos fluorosos, y también a oligonucleótidos completos sintetizados con tales reactivos, y que incluyen uno o más de tales grupos fluorosos. El término "interacción fluorosa" hace referencia a la tendencia de las moléculas fluoradas de asociarse con otra sustancia fluorada. Generalmente, las interacciones fluorosas son más fuertes que las interacciones lipofílicas, lo que permite la utilización de protectores más pequeños para separar más efectivamente las moléculas más largas.

35 El término "hidrocarburo" hace referencia a una porción que incluye átomos de carbono e hidrógeno. Algunos ejemplos de hidrocarburos incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo, grupos alqueno, grupos alquino, grupos arilo, grupos arilalquilo, grupos arilalqueno, grupos arilalquino y similares.

40 Una "porción" o "grupo" hace referencia a una de las porciones en las que algo, tal como una molécula, se divide (por ejemplo, un grupo funcional, el grupo sustituyente, o similares). Por ejemplo, un nucleótido habitualmente incluye un grupo básico (por ejemplo, adenina, timina, citosina, guanina, uracilo, o un grupo básico análogo), una porción glucídica, y uno o más grupos fosfato.

45 Un "anillo heterocíclico" hace referencia a un anillo monocíclico o policíclico que puede ser saturado, insaturado, o aromático, y que incluye uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Un anillo heterocíclico puede estar unido a una porción glucídica, o un análogo de la misma, de un nucleótido de la invención mediante cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Algunos anillos heterocíclicos ejemplares incluyen morfolinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofurano, tetrahidropirano, tetrahidropiridinilo, tetrahidroimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopirano, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopirano, furilo, benzofurano, tiofenilo, benzotiofenilo, pirrolilo, indolilo, isoindolilo, azaindolilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, oxazolilo, isooxazolilo, benzoxazolilo, pirazolilo, imidazolilo, bencimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, piracino, triacino, cinolinilo, ftalacino, quinazolinilo, y similares.

55 Una "secuencia de longitud completa" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que incluye esencialmente, al menos, el mismo número de nucleótidos que una secuencia de referencia o una secuencia de ácido nucleico que es, al menos, parcialmente complementaria a la secuencia de referencia. En ciertas realizaciones de la invención, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico extendida es complementaria a la secuencia de longitud completa de un molde de ácido nucleico u otra secuencia de referencia.

60 El término "unido" hace referencia a interacciones que incluyen, pero que no se limitan a, enlaces covalentes, enlaces iónicos, quimisorción, fisorción, y combinaciones de las mismas.

65 Un "enlazante" hace referencia a una porción química que une covalentemente o no covalentemente (por ejemplo, iónicamente, etc.) un compuesto o el grupo sustituyente a, por ejemplo, un soporte sólido, otro compuesto o grupo, o

similares. Por ejemplo, un enlazante puede adherir un marcador (por ejemplo, un tinte fluorescente, un radioisótopo, etc.) a un nucleótido o similar. Habitualmente, los enlazantes son porciones químicas bifuncionales y, en ciertas realizaciones, incluyen enlaces escindibles, que pueden escindirse mediante, por ejemplo, calor, una enzima, un agente químico, radiación electromagnética, etc. para liberar materiales o compuestos de, por ejemplo, un soporte sólido, otro compuesto, etc. La cauta selección del enlazante permite que la escisión se lleve a cabo en condiciones adecuadas compatibles con la estabilidad del compuesto y el método de ensayo. Generalmente, un enlazante no tiene actividad biológica específica excepto de, por ejemplo, unir conjuntamente especies químicas o preservar una mínima distancia u otra relación espacial entre tales especies. No obstante, los constituyentes de un enlazador pueden seleccionarse para influir en algunas propiedades de las especies químicas enlazadas, tales como la conformación tridimensional, carga neta, hidrofobicidad, etc. Se proporcionan descripciones adicionales de las moléculas enlazantes en, por ejemplo, Lyttle et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(14):2793, Shchepino et al. (2001) *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 20:369, Doronina et al (2001) *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 20:1007, Trawick et al. (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:900, Olejnik et al. (1998) *Methods in Enzymology* 291:135, y Pljevaljcic et al. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125(12):3486.

Un "marcador" o "trazador" hace referencia a una porción unida (covalentemente o no covalentemente), o capaz de unirse a una molécula, la porción de la cual proporciona o es capaz de proporcionar información sobre la molécula (por ejemplo, información descriptiva, identificativa sobre la molécula). Algunos marcadores ejemplares incluyen marcadores fluorescentes, marcadores levemente fluorescentes, marcadores no fluorescentes, marcadores calorimétricos, marcadores quimioluminescentes, marcadores bioluminescentes, marcadores radioactivos, grupos modificadores de la masa, anticuerpos, antígenos, biotina, haptenos, y enzimas (incluyendo, por ejemplo, la peroxidasa, la fosfatasa, etc.).

II. Introducción

Volviendo a la siguiente solicitud escrita y a las ilustraciones, la presente invención proporciona reactivos protectores de oligonucleótidos fluorosos basados en fósforo, así como una metodología para la purificación de oligonucleótidos diana no protegidos mediante la utilización de un medio de separación con una mayor afinidad por los oligonucleótidos protegidos fluorosos, que son subproductos no deseados, tales como por ejemplo, secuencias fallidas y de delección, etc. de una reacción de síntesis química de oligonucleótidos.

III. Síntesis de oligonucleótidos mediante extensiones de nucleótidos simples

La presente invención hace referencia en general a métodos para la protección y/o el bloqueo de la extensión de polímeros, por ejemplo, oligonucleótidos, utilizando un reactivo protector o un monómero protegido. En relación a los oligonucleótidos, el método incluye (a) la puesta en contacto de varios oligonucleótidos con un nucleótido o nucleósido modificado; y (b) la puesta en contacto del producto no reaccionado de (a) con un reactivo protector que incluye un asa de afinidad de perfluoroalquilo.

Habitualmente, el oligonucleótido que se ha de sintetizar incluye, al menos, 3 unidades monoméricas.

En otras realizaciones, los oligómeros están unidos al soporte sólido para los pasos (a) y (b). En otras realizaciones, los oligómeros se escinden del soporte sólido antes del paso (c), en el que los oligómeros no protegidos con la secuencia diana deseada se separan de los oligómeros truncados protegidos mediante metodología de afinidad fluorosa. Algunos ejemplos de soportes sólidos adecuados para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, vidrio, habitualmente un vidrio de poro controlado derivatizado (CPG); sílice, alúmina, zeolitas, polímeros sintéticos o copolímeros tales como el poliestireno; combinaciones de los mismos y similares.

Los métodos y composiciones de la presente invención son adecuados para su utilización en la síntesis y purificación de una amplia variedad de polímeros u oligómeros. En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones y métodos para la síntesis y purificación de biopolímeros. En una realización, el oligómero es un oligonucleótido, que se utilizará para ilustrar la presente invención.

La síntesis de oligonucleótidos sobre una fase sólida puede hacerse utilizando técnicas estándar conocidas en la materia, por ejemplo, el método de fosforamidita de Beaucage et al., 1981, *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862; y el método sobre soporte sólido de la patente de EE.UU. Nº 4.458.066; T. Brown & D. J. S. Brown in *Oligonucleotides and Analogues-A Practical Approach*, (1991) (Eckstein, F., publ. IRL Press en Oxford University Press, Oxford, Nueva York, Tokyo); McBride y Caruthers (1983) *Tetrahedron Letters* 24:245-248 y Sinha et al. (1983) *Tetrahedron Letters* 24:5843-5846, el método de fosfotriéster de Narang et al. (1979) *met. Enzymol.* 68:90-99; el método de fosfodiéster de Brown et al. (1979) *met. Enzymol.* 68:109-151; el método de fosforamidita de Matteucci et al. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103 :3185-3191; entre otros métodos conocidos en la materia. Tales métodos de síntesis se basan esencialmente en la reacción paso a paso de fosforamiditas o H-fosfonatos y el enlace continuo de estos bloques de construcción monoméricos para formar oligómeros. Para ilustrar esto, la figura 1 muestra el ciclo de síntesis de un oligonucleótido que se produce mediante la mezcla de un oligonucleótido con una secuencia correcta y oligonucleótidos protegidos con secuencias incorrectas o fallidas en varias proporciones, de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención. Los nucleótidos pueden extenderse mediante el grupo hidroxilo en la posición 3' o 5' de

un anillo glucídico intacto (por ejemplo, un anillo glucídico de pentosa) o un anillo de un análogo glucídico (por ejemplo, un anillo carbocíclico, etc.). Como mera ilustración, la figura 1 muestra que la síntesis se lleva a cabo en dirección 3'-5' mediante la adición de nucleótidos en el extremo 5' de la cadena creciente. Además, mientras la figura 1 sólo muestra la extensión y protección de un par de monómeros, la presente invención no se limita a este número o tamaño de los ácidos nucleicos que se sintetizan o purifiquen. La síntesis en esta dirección se lleva a cabo utilizando fosforamiditas nucleótidas en las que el grupo fosforamidita está unido al oxígeno 3' y un grupo protector o bloqueador (por ejemplo, un grupo bloqueador negativamente cargado, un grupo bloqueador voluminoso, y/o similares).

En el método del soporte sólido, se une un nucleótido inicial al soporte sólido. El oligonucleótido se extiende mediante la adición secuencial de nucleótidos hasta que se obtiene la secuencia deseada. La extensión secuencial incluye los siguientes pasos:

1. Sustraer un grupo protector de la cadena de oligonucleótido, unida a un soporte y parcialmente sintetizada, para generar un grupo hidroxilo reactivo;
2. Unir un nucleótido a la cadena de oligonucleótido unida a un soporte mediante un enlace fosfito;
3. Oxidar el enlace fosfito para producir un enlace fosfato; y
4. Proteger los grupos hidroxilo no reaccionados de cualquier oligonucleótido unido a un soporte no extendido.

Inicialmente, el hidroxilo 5' de los nucleótidos 1a y 1b también se bloquea o se protege con un grupo protector adecuado que puede sustraerse selectivamente. Algunos ejemplos de grupos protectores adecuados incluyen pero no se limitan a, grupos tritilo, tales como 4, 4'-dimetoxitritilo (DMT), grupos sililo, tales como t-butildimetilsililo (TBDMS); grupos acilo, tales como t-butoxicarbonilo (BOC), y similares. Cuando se sintetiza en esta dirección, el producto obtenido con anterioridad a la sustracción del grupo protector final es un oligonucleótido con un grupo protector unido al extremo 5' terminal.

Alternativamente, la síntesis de oligonucleótidos puede llevarse a cabo en la dirección 5'-3' mediante la adición de nucleótidos al extremo 3' de la cadena creciente. La síntesis en esta dirección se lleva a cabo utilizando fosforamiditas nucleótidas en el que el grupo fosforamidita se une al oxígeno 5', y a un grupo protector, habitualmente también un grupo dimetoxitritilo, se une al oxígeno 3'. Cuando se sintetizan en esta dirección, el producto obtenido con anterioridad a la eliminación del grupo protector final es un oligonucleótido con un grupo protector unido en el extremo 3' terminal.

La síntesis en la dirección 5'-3' proporciona un método conveniente de síntesis de un oligonucleótido con un grupo bloqueador unido en el oxígeno 3' terminal. La omisión de un paso de desprotección tras la adición del nucleótido final a la cadena de oligonucleótido resulta en la síntesis de un oligonucleótido con un grupo protector (es decir, bloqueador) unido en el oxígeno 3' terminal.

En el paso de desbloqueo o desprotección se elimina el grupo protector del hidroxilo 5' para formar un compuesto con un hidroxilo 5' libre en 2a y 2b. Las condiciones para eliminar un grupo protector particular dependen del grupo protector utilizado. En el caso del DMT, se puede llevar a cabo mediante la adición de un ácido, tal como el ácido dicloroacético (DCA) o el ácido tricloroacético (TCA) en diclorometano.

En el paso de acoplamiento o de condensación de nucleótidos el hidroxilo 5' de 2a y 2b se acopla con un nucleótido activado 2c para formar el nucleótido extendido de una secuencia particular. La activación del nucleótido puede lograrse mediante la utilización de una fosforamidita nucleósida en presencia de un compuesto tetrazol que combina el hidroxilo 5' del primer nucleótido para formar un enlace fosfito 3a.

La subsiguiente oxidación convierte el enlace fosfito de 3b en el enlace fosfato de 4b. Algunos ejemplos de las condiciones de oxidación incluyen la dilución de yodo acuoso en piridina y tetrahidrofurano.

Independientemente del método utilizado, en cada ciclo sintético hay un paso de protección en el que se introduce un protector en los grupos funcionales terminales no reaccionados de la cadena creciente del oligonucleótido que no pudo extenderse en el paso de acoplamiento 2a previo. Los nucleótidos no extendidos se protegen 3a para que no reaccionen en los ciclos subsiguientes de extensión de la secuencia para formar oligos con secuencias de delección.

Sin ser limitante, la protección durante la síntesis de oligonucleótidos puede llevarse a cabo haciendo pasar el reactivo protector, que incluye una mezcla de anhídrido acético y N-metilimidazol en THF/piridina, a través de la columna al final de cada ciclo de acoplamiento. Se pueden utilizar varios compuestos básicos para ajustar el pH de la mezcla de la reacción, incluyendo, pero sin limitarse a, KOH, NaOH, y similares de entre muchos conocidos en la materia. Habitualmente, el nucleótido es el reactivo limitante. Aunque pueden utilizarse otras condiciones de temperatura de manera opcional, habitualmente estas reacciones de síntesis se llevan a cabo a temperatura ambiente o similar. Sin ser limitante, en general, estas reacciones se dejan proceder durante aproximadamente 100-500 segundos.

Es posible realizar el paso de protección antes del paso de oxidación. Entonces, cada uno de estos pasos se repite hasta que se ha sintetizado el oligonucleótido de la secuencia deseada.

Tras el último paso de extensión, el oligonucleótido se escinde del soporte sólido de acuerdo con las técnicas estándar de la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida conocidas en la materia. Por ejemplo, tal y como se muestra en la figura 2, esto puede llevarse a cabo incubando el producto en una base, incluyendo, pero sin limitarse a amonio, hidróxido de amonio y similares durante aproximadamente 6-24 horas. El producto crudo es una mezcla del oligonucleótido deseado, las secuencias fallidas, los grupos escindidos y las soluciones de reacción. El grupo protector terminal del oligonucleótido 5b puede eliminarse o no en este paso. Los protectores de la presente invención están diseñados de manera que son estables durante la síntesis y el procesamiento del oligonucleótido.

A partir de esto, se obtiene una mezcla del producto 5b de oligonucleótidos de longitud completa y secuencias truncadas fallidas/contaminantes 4a. Tras la escisión del soporte sólido, la mezcla de la reacción se concentra, al menos parcialmente o completamente, bajo condiciones de presión reducida para sustraer los disolventes y los reactivos volátiles. En ciertas realizaciones, se puede añadir un tampón acuoso adecuado a la solución residual o al residuo sólido de las mezclas del producto polimérico. La solución parcialmente concentrada o el residuo sólido obtenidos de este modo pueden purificarse tal y como se describe en detalle más adelante.

Preferiblemente, la reacción de síntesis se lleva a cabo en un sintetizador de DNA automático comercialmente disponible (por ejemplo, un sintetizador de DNA ABI 394 de Applied Biosystems, Foster City, Calif.) utilizando fosforamiditas nucleósidas comercialmente disponibles (por ejemplo, de Glen Research, Sterling, VA.). Las fosforamiditas nucleósidas que pueden utilizarse para la síntesis en la dirección 5'-3', y que contienen un grupo dimetoxitritilo unido al oxígeno 3' también están disponibles comercialmente por Glen Research (Sterling, Va.).

La síntesis de oligómeros protegidos ejemplares se describe en los ejemplos. Pueden sintetizarse oligómeros protegidos adicionales utilizando de forma análoga métodos de síntesis estándar.

De este modo, en un grupo de realizaciones, la invención proporciona un método para la preparación de un oligonucleótido modificado que incluye X nucleótidos o nucleósidos en los que X es un número entero mayor que 3; el método incluye

- (a) la puesta en contacto de varios oligonucleótidos, y cada uno incluye X-n nucleótidos o unidades de nucleósido, con un nucleótido o nucleósido modificado, en el que n es un número entero de 1 a X-1; y
- (b) la puesta en contacto del producto no reaccionado de (a) con un reactivo protector que incluye un asa de afinidad de perfluoroalquilo. En otro grupo de realizaciones, el soporte sólido se selecciona a partir del grupo que incluye vidrio, sílice, alúmina, zeolitas, polímeros sintéticos o copolímeros y combinaciones de los mismos. En otro grupo de realizaciones, el nucleótido modificado es un nucleótido protegido. En otro grupo de realizaciones, el oligonucleótido se prepara en dirección 3'-5'. En otro grupo de realizaciones, el oligonucleótido se prepara en dirección 5'-3'. En otro grupo de realizaciones, el reactivo protector es uno de los reactivos de las realizaciones descritas aquí.

IV. Reactivos protectores

Además, la invención también proporciona reactivos protectores y métodos de producción de reactivos protectores. Los protectores incluyen un asa de afinidad fluorosa que puede retenerse mediante una cromatografía por afinidad fluorosa para que retenga los oligómeros de entre 4 y 100 o más monómeros. En varios grupos de realizaciones se pueden purificar 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 monómeros de las secuencias fallidas más cortas. Algunos ejemplos de tales asas de afinidad incluyen, pero no se limitan a, grupos perfluoroalquilo. Así, en una realización de la presente invención, el protector se deriva con una porción fluorosa capaz de unirse a un soporte de afinidad fluorosa. Cuando la purificación por afinidad fluorosa se ha llevado a cabo, se acopla un protector fluoroso a las secuencias fallidas, permitiendo que las secuencias fallidas se retengan selectivamente en el soporte de afinidad fluorosa.

El asa de afinidad puede unirse a varios grupos funcionales, incluyendo, pero sin limitarse a, fosforamidita o un clorofosfito.

De acuerdo con esto, en una realización de la presente invención se utiliza la purificación por afinidad fluorosa en una reacción de la síntesis de oligonucleótidos. En esta realización, se utiliza un reactivo protector fluoroso basado en fósforo. Habitualmente, un reactivo protector fluoroso basado en fósforo de acuerdo con la presente invención se describe con la fórmula (I):



En el que R¹ se selecciona a partir del grupo que consiste en alquiloxi C₁-C₈-, alquenoiloxi C₂-C₈- y alquinoxiloxi C₂-C₈-, opcionalmente sustituido con CN;

R² es un halógeno o NR⁴₂;

R³ tiene la fórmula – L-A;

cada R⁴ es un alquilo C₁-C₆ o está combinado para formar un anillo heterocíclico de 4 a 7 miembros, opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆-, haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆-, arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcoxicarbonilo C₁-C₆;

L es un C₁-C₁₀alquilenoxi-, que se sustituye opcionalmente con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆-, haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆-, arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcoxicarbonilo C₁-C₆; y

A es un perfluoroalquilo C₁-C₃₀;

En ciertas realizaciones, R¹ es -OCH₃. En otro grupo de realizaciones, R¹ es -OCH₂CH=CH₂. En otro grupo de realizaciones, R¹ es -OCH₂CH₂CN.

En ciertas realizaciones, R² es un halógeno. En otro grupo de realizaciones, R² se selecciona del grupo que incluye -N(Me)₂, -N(Et)₂, -N(Pr)₂, -N(i-Pr)₂, 1-pirrolidinilo, 1-piperidinilo, 4-morfolinilo y 1-imidazolilo. En otro grupo de realizaciones, R² es -N(i-Pr)₂.

En ciertas realizaciones, R³ tiene la fórmula -O-(CH₂)_m(CF₂)_pCF₃; m está entre aproximadamente 1 y 30. En varios grupos de realizaciones, m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30. En otro grupo de realizaciones, m es 3 y p es 7.

Los compuestos protectores de acuerdo con la invención pueden sintetizarse de varias maneras. En algunos casos se puede comenzar con precursores comercialmente disponibles. La figura 3 ilustra la síntesis de un reactivo protector fluoroso basado en fósforo de la presente invención. Además, la figura 3b muestra un paso en la síntesis de 2-cianoetil-N', N'-diisopropil-3-perfluoroalquil-propiloxi-foforamidita de acuerdo con una realización de la invención. Los perfluoroalcoholes, tales como 3-(perfluorooctil)propanol y 3-(perfluorohexil)propanol están comercialmente disponibles de compañías tales como Fluorous Technologies, Inc. (Pittsburgh, Pa.). Las halofosforamiditas, tales como 2-cianoetildisopropilclorofosforamidita, están comercialmente disponibles de compañías tales como Sigma-Aldrich, Inc. (St Louis, Mo.).

La utilización de los compuestos de acuerdo con la invención para proteger a los ácidos nucleicos y que proporcionan un asa que permite la purificación de ácidos nucleicos de una secuencia deseada ha probado que es particularmente ventajosa, especialmente en comparación con los reactivos protectores clásicos, tales como el anhídrido acético. Una ventaja es la estabilidad química bajo un amplio intervalo de condiciones de pH. Otra ventaja del presente método es que permite una fácil separación de los oligonucleótido de longitud completa de las secuencias fallidas. Dada la eficiencia de la purificación, los oligonucleótidos de longitud completa pueden obtenerse con un alto rendimiento y pureza.

En los ejemplos de más abajo se proporcionan vías sintéticas adicionales y otros aspectos relacionados con la producción de los reactivos protectores de la invención. Se pueden adaptar varias técnicas sintéticas para su utilización en los protocolos de síntesis de la presente invención, ejemplos de las cuales se conocen y se describen de forma general en, por ejemplo, March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 4^a Ed., John Wiley & Sons, Inc. (1992), y Carey y Sundberg, *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanism*, 4^a Ed., Plenum Press (2000). Los materiales químicos de inicio y otros componentes de la reacción útiles en la síntesis de los reactivos protectores de la presente invención ya están disponibles por varios distribuidores comerciales, incluyendo, por ejemplo, Sigma-Aldrich, Inc. (St Louis, Mo.) y Fluorous Technologies, Inc. (Pittsburgh, Pa.).

Los reactivos protectores pueden purificarse con anterioridad a su utilización mediante una variedad de técnicas de separación, incluyendo, pero sin limitarse a, la cromatografía líquida, y similares. Además, se describen varias técnicas de separación que son útiles o que pueden adaptarse en la purificación de los reactivos protectores en, por ejemplo, Skoog et al., *Principles of Instrumental Analysis*, 5^a Ed., Harcourt Brace College Publishers (1998) y Currell, *Analytical Instrumentation: Performance Characteristics and Quality*, John Wiley & Sons, Inc. (2000).

V. Purificación por afinidad fluorosa de oligonucleótidos

En la afinidad fluorosa, se purifican las moléculas que contienen perfluoroalquilo o grupos fluorosos utilizando su afinidad por el medio perfluorado. Las interacciones por afinidad fluorosa son fuertes y distinguibles de otros tipos de interacciones por afinidad (por ejemplo, lipofilidad). Así, en una realización, se pueden purificar los oligómeros con la secuencia correcta de las secuencias fallidas mediante la protección de las secuencias fallidas con un grupo protector fluoroso y la posterior utilización de una técnica de separación fluorosa para separar las moléculas protegidas de los oligómeros con la secuencia correcta. Algunos ejemplos de las técnicas de separación fluorosa incluyen, pero no se

limitan a, cromatografía por afinidad tal como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la extracción en fase sólida ("SPE" o "purificación en cartucho") en gel de sílice de fase reversa fluorosa (FRPSG) (véase, por ejemplo, extracción en fase líquida), la filtración y similares.

5 En relación con la figura 4, se muestra esquemáticamente y de forma general la metodología para la purificación del oligonucleótido de la presente invención que incluye los siguientes pasos ordenados. De este modo, después de la preparación del oligonucleótido tal y como se describe anteriormente mediante (a) la puesta en contacto de los oligonucleótidos con un nucleótido o nucleósido modificado; y (b) la puesta en contacto de los productos que no han reaccionado de (a) con el reactivo protector que incluye un asa de afinidad de perfluoroalquilo, el oligonucleótido se
10 purifica mediante: (c) la separación de los oligómeros no protegidos de la secuencia diana deseada de los oligómeros truncados no protegidos de (b) mediante la metodología de afinidad fluorosa. En otro grupo de realizaciones, los distintos oligómeros se adhieren a un soporte sólido para los pasos (a) y (b) y se escinden del soporte sólido antes del paso (c).

15 Más particularmente, y continuando la referencia a la figura 4, la mezcla heterogénea de los productos y reactivos de la síntesis de oligonucleótidos, incluyendo el oligonucleótido 4a con la secuencia fallida protegida y fluorosa, se hace pasar a través de un cartucho o columna que contiene un adsorbente o medio que lleva los grupos de afinidad fluorosa en un soporte sólido, dando lugar a la captura de las secuencias fallidas de oligonucleótidos protegidos fluorosos para producir el complejo 5a. Los materiales no deseados que contienen un oligonucleótido protegido fluoroso 4a, interaccionan con el adsorbente, por lo que el lavado del adsorbente con al menos un primer disolvente adecuado permite la elución del oligonucleótido 5b no protegido deseado, dejando sólo el complejo 5a. La disociación de los oligonucleótidos 5b protegidos fluorosos no deseados del adsorbente puede lograrse mediante el lavado con un segundo disolvente más fluorofílico. En los casos donde se retienen los oligonucleótidos con la secuencia fallida protegida fluorosa, el oligonucleótido 5b no protegido es el compuesto purificado diana final.

25 Por consiguiente, en otro grupo de realizaciones, la purificación incluye:

(i) hacer pasar el producto del paso (b) a través de un medio de afinidad fluorosa para que tal medio de afinidad fluorosa adsorba los oligómeros protegidos; y

(ii) lavar el medio de afinidad fluorosa de los oligómeros no protegidos con la secuencia diana deseada.

35 En otras realizaciones, se puede utilizar más de un grupo fluoroso en cualquiera de los reactivos descritos en esta solicitud si se requieren interacciones de afinidad más exigentes para el medio de separación empleado en la purificación posterior. Esto se puede lograr mediante la unión de más de un grupo fluoroso a la estructura de fósforo, o mediante la utilización de un enlazante que acomoda una o más cadenas fluorosas ramificadas.

40 El medio de separación incluye cualquier grupo que demuestre una fuerte interacción con el grupo fluoroso de los reactivos de oligonucleótidos de la presente invención. Así, en una realización, el medio de separación puede ser un adsorbente de fase reversa lipofílico convencional basado en una matriz de sílice, poli(divinilbenceno) o poliestireno entrecruzado con divinilbenceno. En otras realizaciones, el medio de separación incluye un adsorbente de fase reversa que lleva grupos fluorados, incluyendo, por ejemplo, un polimeroico (tal como, por ejemplo, poli(divinilbenceno) o poliestireno entrecruzado con divinilbenceno) o una matriz de sílice que lleva grupos orgánicos fluorados. Algunos adsorbentes alternativos incluyen FLUOROFASH (Fluorous Technologies, Inc.), un material
45 basado en sílice que lleva grupos fluorados, y cartuchos poliPAK (Glen Research Corporation) y OPC (Applied Biosystems, Inc.), que utilizan adsorbentes de fase reversa polimeroicos, aunque, en la práctica, se puede utilizar cualquier fase sólida o líquida que lleve grupos fluorofílicos.

50 VI. Nucleótidos y composiciones de nucleótidos

La invención también proporciona nucleótidos, oligonucleótidos y otras composiciones, por ejemplo, soluciones de reactivos y mezclas de reacción, que incluyen al menos un reactivo o porción protectora, tal y como se describe aquí. En algunas realizaciones, la invención proporciona una porción de nucleósido modificada con la fórmula:



En la que Nu es un nucleósido;

60 R^3 tiene la fórmula – L-A;

L es un alquilenoxi $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, que se sustituye opcionalmente con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ -, haloalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ -, alcoxi $\text{C}_1\text{-C}_6$ -, arilalcoxi $\text{C}_1\text{-C}_6$ -, oxo- y alcoxycarbonilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ -;

65 A es un perfluoroalquilo $\text{C}_1\text{-C}_{30}$; y

~ indica el punto de unión al oxígeno del hidroxilo del oligonucleótido. En algunas realizaciones, el nucleósido puede incluir grupos protectores convencionales. Algunos ejemplos más específicos de tales reactivos alternativos son, por ejemplo, los reactivos de nucleósido que incluyen al menos un grupo fluoroso incorporado permanentemente que se proporcionan aquí. En otras realizaciones, la invención proporciona un oligonucleótido producido mediante los métodos descritos aquí.

En algunas realizaciones, las composiciones también pueden incluir un soporte sólido al cual se une de manera opcional el nucleósido u oligonucleótido modificado. Algunos ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, sílice, alúmina, zeolitas, polímeros sintéticos o copolímeros, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la invención proporciona una solución de reactivo que incluye, al menos, un reactivo protector tal y como se describe aquí. En otras realizaciones, la invención proporciona una mezcla de reacción que incluye, al menos, una porción protectora tal y como se describe aquí. En estas realizaciones, las composiciones también pueden incluir, al menos, uno de: (a) al menos un disolvente; (b) al menos un monómero extensible, por ejemplo, los nucleótidos A o un nucleótido modificado; (c) al menos un catalizador; y (d) al menos un tampón. La proporción entre el reactivo o porción protectora y el(los) otro(s) componente(s) en la composición depende de la naturaleza del(los) otro(s) componente(s) de la composición y del método para la elaboración de la composición. Se proporcionan ejemplos adicionales y no limitantes de composiciones de la invención en el apartado de ejemplos.

VIII. Kits

La presente invención también proporciona kits, por ejemplo, para la síntesis y purificación de oligonucleótidos. Los kits incluyen como componente, al menos, un reactivo protector, tal y como se describe aquí. En algunas realizaciones, el kit también incluye una o más de: (a) al menos un monómero extensible, por ejemplo, un nucleótido o un nucleótido modificado o una fosforamidita; (b) al menos un soporte sólido; (c) al menos un catalizador para su utilización en la extensión de los oligonucleótidos; (d) al menos un tampón; (e) al menos una serie de instrucciones para la extensión de los oligonucleótidos, por ejemplo, un ácido nucleico, utilizando los componentes del kit; y (f) al menos un contenedor para el empaquetado de los componentes del kit.

Los ejemplos experimentales siguientes demuestran de manera adicional la metodología anterior utilizando los reactivos de oligonucleótidos protegidos fluorosos tal y como se describe aquí. Los siguientes ejemplos se ofrecen como mero medio de ilustración y no pretenden limitar el ámbito de la invención reivindicada. Para los expertos en la materia, numerosas realizaciones de la invención dentro del ámbito de las reivindicaciones que siguen a los ejemplos serán aparentes tras la lectura del texto anterior y los ejemplos siguientes.

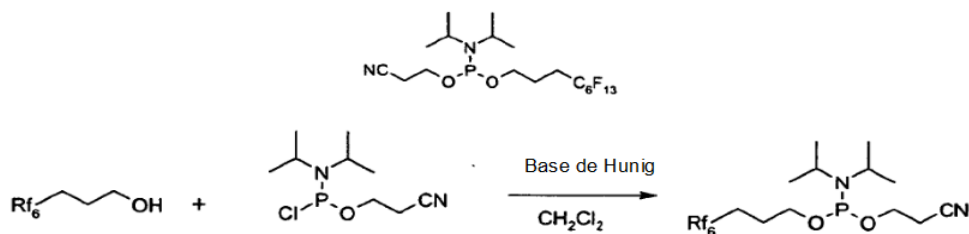
Ejemplos

Métodos analíticos generales

Todos los análisis con TLC se llevaron a cabo utilizando EM Science #5715-7, gel de sílice 60 F₂₅₄, placas de TLC de 0,25 mm de grosor. Todos los cromatogramas GC se obtuvieron mediante la utilización de un cromatógrafo de gas HP5890 Serie II con un detector FID y un Agilent #19091Z-413, HP-1, 30m x 0,32 mm, columna de 25 micras. Todos los espectros de RMN se obtuvieron mediante una RNM Bruker 270 MHz.

Ejemplo 1

Preparación del reactivo protector 1: 2-cianoetil-N,N'-diisopropil 3-perfluorhexil-propiloxi-fosforamidita



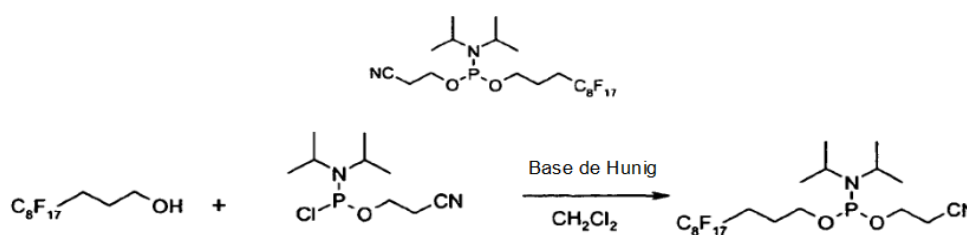
Materiales de partida	Peso de la fórmula	d	Cantidad	mmol	Eq.
Propanol Rf ₆	378,14		0,945 g	2,50	1,00
Clorofosforamidita	236,68	1,06	0,670 ml	3,00	1,20
Base de Hunig	101,29	0,73	1,25 ml	8,98	3,59
CH ₂ Cl ₂			40 ml		

De manera general, la síntesis de un ejemplo de fosforamidita 4e derivada fluorosa se logró tal y como sigue y se

muestra en la figura 4 más abajo. El propanol Rf₆ (945 mg, 2,50 mmol, 1,0 equiv.) (N° catálogo FTI F017029) y la base de Hunig (1,25 ml, 8,98 mmol, 3,60 equiv.) se disolvieron en 40 ml de CH₂Cl₂ en un frasco de base redonda de 100 ml. Entonces se añadió 2-cianoetil-diisopropilclorofosforamidita (catálogo Aldrich #30,230-9) (670 ml, 3,0 mmol, 1,20 equiv.) durante 5 minutos y se continuó la agitación a temperatura ambiente. Tras 1 h. se completó la reacción, como se puede observar mediante la desaparición del propanol en la TLC (eluyente: etilacetato al 20% en hexanos; visualización: tinción de KMnO₄; propanol Rf₆: Rf=0,30; fosforamidita producto: Rf=0,70). La reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (60 ml) y la capa orgánica se lavó rápidamente con H₂O, una solución saturada de NaHCO₃, y una solución saturada de NH₄Cl (25 ml cada una). La capa de CH₂Cl₂ se concentró mediante la evaporación rotatoria y el residuo se sometió a filtración en gel de sílice en un embudo de vidrio fritado de 60 ml utilizando etilacetato al 20% en hexanos (~150 ml). El filtrado se concentró mediante evaporación rotatoria y se secó al vacío para proporcionar un aceite incoloro y claro. Peso molecular: 578,36 para la fórmula molecular: C₁₈H₂₄F₁₃N₂O₂P. Rendimiento: 1,20 g, rendimiento del 81%. Pureza: >95% mediante GC. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,57-3,87 (m, 6H), 2,65 (t, 2H), 2,10-2,38 (m, 2H), 1,89-2,01 (m, 2H), 1,17-1,21 (2 dobletes superpuestos, 12 H).

15 Ejemplo 2

Preparación del reactivo protector 2: 2-cianoetil-N'-N'-diisopropil-3-perfluorooctil-propiloxifosforamidita



Materiales de partida	Peso de la fórmula	d	Cantidad	mmol	Eq.
Propanol Rf ₈	478,14		1,2 g	2,51	1,00
Clorofosforamidita	236,68	1,06	0,670 ml	3,00	1,20
Base de Hunig	101,29	0,73	1,25 ml	8,98	3,58
CH ₂ Cl ₂			40 ml		

20 El propanol Rf₈ (1,2 g, 2,51 mmol, 1,0 equiv.) y la base de Hunig (1,25 ml, 8,98 mmol, 3,58 equiv.) se disolvieron en 40 ml de CH₂Cl₂ en un frasco de base redonda de 100 ml. Entonces se añadió clorofosforamidita (670 ml, 3,0 mmol, 1,20 equiv.) durante 5 minutos y se continuó la agitación a temperatura ambiente. Tras 1 h. se completó la reacción, como se puede observar mediante la desaparición del propanol en la TLC (eluyente: etilacetato al 20% en hexanos; visualización: tinción de KMnO₄; propanol Rf₈: Rf=0,30; fosforamidita producto: Rf=0,70). La reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (60 ml) y la capa orgánica se lavó rápidamente con H₂O, una solución saturada de NaHCO₃, y una solución saturada de NH₄Cl (25 ml cada una). La capa de CH₂Cl₂ se concentró mediante la evaporación rotatoria y el residuo se sometió a filtración en gel de sílice en un embudo de vidrio fritado de 60 ml utilizando etilacetato al 20% en hexanos (~150 ml). El filtrado se concentró mediante evaporación rotatoria y se secó al vacío para proporcionar un aceite naranja. Peso molecular: 678,36 para la fórmula molecular: C₂₀H₂₄F₁₇N₂O₂P. Rendimiento: 1,40 g, rendimiento del 82%. Pureza: >88% mediante GC. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 3,57-3,87 (m, 6H), 2,65 (t, 2H), 2,10-2,38 (m, 2H), 1,89-2,01 (m, 2H), 1,17-1,21 (2 dobletes superpuestos, 12 H).

Ejemplo 3

35 i. Procedimientos de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, ciclados y automatizados mediante la utilización de un reactivo protector fluoroso (PFC₈C₃ fosforamidita)

Se sintetizó una secuencia poli-T (T-15) en el instrumento ABI 394 mediante la utilización de un ciclo sin tritilo y un protocolo de protección modificado. Este experimento se diseñó de tal manera que se redujo la eficiencia de acoplamiento para cada paso de adición de nucleótidos. Esto se logró mediante la reducción de la concentración de la fosforamidita de los 0,1 M estándar a los 0,02 M. La eficiencia reducida aseguró la producción de concentraciones suficientes de las secuencias truncadas para hacer que este ejemplo ilustre claramente la utilidad de esta invención para purificar rápidamente los oligonucleótidos deseados de las secuencias fallidas. Se añadieron fosforamiditas básicas estándar utilizando el ciclo de síntesis estándar de 1 μmol con un tiempo de acoplamiento de 30 s. La FC₈C₃ fosforamidita se disolvió en acetonitrilo a una concentración de 0,1 M y se colocó en la posición para botellas 5 del sintetizador de DNA. El ciclo de protección estándar se sustituyó por un ciclo de acoplamiento de la PFC₈C₃

fosforamidita + activador con un tiempo de apareamiento de 200 s. El oligonucleótido se sometió a condiciones de desprotección estándar (hidróxido de amino al 30% a 55 °C durante la noche) y se almacenó a -20°C hasta que se necesitó purificar el cartucho. Se desaló una alícuota en 1 X TE con una columna NAP-1, y se analizó mediante la HPLC de intercambio iónico utilizando un gradiente de cloruro sódico en 20 mM de hidróxido de sodio en una columna Dionex Nucleopak-100.

ii. Desprotección del oligodesoxirribonucleótido

Se sustrajo el soporte sólido de la columna y se expuso a 1 ml de hidróxido de amonio concentrado a temperatura ambiente durante cuatro horas en un tubo cerrado. Entonces, se retiró el soporte mediante filtración y la solución que contenía el oligodesoxirribonucleótido parcialmente protegido se llevó a los 55 °C durante cinco horas. El amonio se puede extraer, no obstante, una ventaja de la presente invención es que el residuo se puede purificar directamente, tal y como se describe abajo, sin la extracción del amonio.

Ejemplo 4

Sustracción de las secuencias fallidas protegidas del oligonucleótido no protegido mediante la purificación del cartucho fluoroso

La utilidad del método fluoroso para la purificación de oligonucleótidos se ilustró utilizando la extracción en fase sólida ("SPE" o "purificación del cartucho"). El oligonucleótido desprotegido crudo (4a y 5b) se diluyó con el mismo volumen de tampón de carga (cloruro sódico al 10% y dimetilformamida al 5% en agua) de Berry and Associates, Dexter, MI. También se adquirió un cartucho de afinidad fluorosa (fluoro-pak II) de Berry and Associates, Dexter, MI., y se preconditionó mediante el pase de 2 ml de acetonitrilo seguidos de 2 ml de acetato de trietilamonio 0,1 M (TEAA), y seguido de 2 ml de tampón de carga. Se mantuvo una velocidad de flujo de 2 segundos por gota en estos pasos, tal y como recomienda el fabricante. La purificación del oligonucleótido crudo se logró mediante el simple pase de la mezcla del oligonucleótido y el tampón de carga por la columna preconditionada a una velocidad de flujo de 5 segundos por gota, donde se pasó el oligonucleótido de longitud completa deseado a través de la columna y se retuvieron cuantitativamente las secuencias fallidas protegidas fluorosas contaminantes. Un rápido paso adicional de desalación en NAP-10 fue suficiente para sustraer el amonio y la sal del oligonucleótido. Las secuencias fallidas se eluyeron del cartucho fluoroso y se analizaron mediante una HPLC de intercambio iónico.

El análisis mediante HPLC de estas mezclas de oligonucleótidos crudos mostró que los oligonucleótidos de longitud completa protegidos fluorosos se retienen sumamente en un adsorbente de HPLC fluoroso. Para ilustrar la magnitud de la retención, la figura 5 muestra un análisis mediante HPLC de T-15 crudo protegido fluoroso que presenta secuencias fallidas y correctas. La figura 6 muestra un análisis mediante HPLC del producto filtrado a través de un cartucho fluoroso FLURO-PAK™. La elución mostró una unión completa de los oligómeros protegidos (secuencias fallidas), mientras que la mayor parte del material no fluoroso (la secuencia correcta) no se unió. La purificación en DMT no puede lograr este nivel de selectividad con oligonucleótidos largos. La figura 7 muestra un análisis mediante HPLC de las impurezas liberadas de la columna tras la filtración a través de un cartucho fluoroso mediante el lavado de la columna con acetonitrilo al 40% en 0,1 M TEAA. El eluyente muestra la eliminación de las secuencias fallidas. Estas figuras muestran que el material protegido fluoroso 4a se retiene intensamente en relación a los 15-meros protegidos no fluorosos, que sólo eluyen cuando el porcentaje de acetonitrilo se acercó al 50% en el perfil del gradiente. Debe observarse que una elución isocrática dio diferencias incluso mayores en los tiempos de retención. La figura 8 muestra el análisis mediante HPLC del filtrado que contiene el oligonucleótido 15-mero purificado fluoroso tras un paso de desalación en NAP-10. Estos ejemplos muestran que el presente método permite una fácil separación de los oligonucleótidos de longitud completa de las secuencias fallidas. Gracias a la eficiencia de la purificación de los oligonucleótidos de longitud completa se puede obtener un alto rendimiento y pureza.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto con la fórmula (I):



en el que R^1 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquiloxi C_1-C_8 -, alqueniiloxi C_2-C_8 - y alquiniiloxi C_2-C_8 -, opcionalmente sustituido con CN;

10 R^2 es un halógeno o $-NR^4_2$;

R^3 tiene la fórmula – L-A;

15 cada R^4 es un alquilo C_1-C_6 o está combinado para formar un anillo heterocíclico de 4 a 7 miembros, opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 -, haloalquilo C_1-C_6 -, alcoxi C_1-C_6 -, arilalcoxi C_1-C_6 -, oxo- y alcoxycarbonilo C_1-C_6 ;

20 L es un alquilenoxi C_1-C_{10} -, que se sustituye opcionalmente con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 -, haloalquilo C_1-C_6 -, alcoxi C_1-C_6 -, arilalcoxi C_1-C_6 -, oxo- y alcoxycarbonilo C_1-C_6 -; y

A es un perfluoroalquilo C_1-C_{30} ;

25 y donde un grupo alquilo hace referencia a una porción de hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico,

con la condición de que se excluyan el compuesto con la fórmula $PR^1R^2R^3$,

30 en el que R^1 es $-OCH_2CH_2CN$, R^2 es $-N(i-Pr)_2$ y R^3 es $-OCH_2CF_3$ y el compuesto con fórmula $PR^1R^2R^3$, donde R^1 es $-O$ -terc-butilo, R^2 es $-N(Et)_2$, y R^3 es $-OCOCF_3$.

2. El compuesto de la reivindicación 1, donde R^1 es $-OCH_3$.

3. El compuesto de la reivindicación 1, donde R^1 es $-O-CH_2CH=CH_2$.

35 4. El compuesto de la reivindicación 1, donde R^1 es $-OCH_2CH_2CN$.

5. El compuesto de las reivindicaciones 1-4, donde R^2 es halógeno.

40 6. El compuesto de las reivindicaciones 1-4, donde R^2 se selecciona del grupo que incluye $-N(Me)_2$, $-N(Et)_2$, $-N(Pr)_2$, $-N(i-Pr)_2$, 1-pirrolidnilo, 1-piperidinilo, 4-morfolinilo y 1-imidazolilo,

7. El compuesto de las reivindicaciones 1-4, donde R^2 es $-N(i-Pr)_2$.

45 8. El compuesto de las reivindicaciones 1-7, donde R^3 tiene la fórmula $-O-(CH_2)_m(CF_2)_pCF_3$; m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30.

9. Un compuesto de la reivindicación 8, donde m es 3 y p es 5.

50 10. Un compuesto de la reivindicación 8, donde m es 3 y p es 7.

11. Un método para la inhibición de la extensión de un oligonucleótido, y el método incluye la puesta en contacto de un oligonucleótido con un compuesto con o sin un catalizador, y dicho compuesto tiene la fórmula (I):



En el que R^1 se selecciona a partir del grupo que consiste en alquiloxi C_1-C_8 -, alqueniiloxi C_2-C_8 - y alquiniiloxi C_2-C_8 -, opcionalmente sustituido con CN;

60 R^2 es un halógeno o $-NR^4_2$;

R^3 tiene la fórmula – L-A;

65 cada R^4 es un alquilo C_1-C_6 o está combinado para formar un anillo heterocíclico de 4 a 7 miembros, opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 -, haloalquilo C_1-C_6 -, alcoxi C_1-C_6 -, arilalcoxi C_1-C_6 -, oxo- y alcoxycarbonilo C_1-C_6 ;

L es un alquilenoxi C₁-C₁₀-, que se sustituye opcionalmente con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆ -, haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆-, arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcoxicarbonilo C₁-C₆-; y

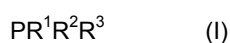
5 A es un C₁-C₃₀perfluoroalquilo;

y donde un grupo alquilo hace referencia a una porción de hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico.

10 12. Un método para la preparación de un oligonucleótido modificado que incluye X nucleótidos donde X es un número entero mayor que 3; y el método incluye

(a) la puesta en contacto de varios oligonucleótidos, y cada uno incluye X-n unidades de nucleótido, con un nucleótido o nucleósido modificados, donde n es un número entero de 1 a X-1; y

15 (b) la puesta en contacto del producto no reaccionado de (a) con un reactivo protector que incluye un compuesto con la fórmula (I):



20 En el que R¹ se selecciona a partir del grupo que consiste en C₁-C₈alquiloxi-, C₂-C₈alquileniloxi- y C₂-C₈alquiniloxi-, opcionalmente sustituido con CN;

R² es un halógeno o NR₂⁴;

25 R³ tiene la fórmula – L-A;

cada R⁴ es un alquilo C₁-C₆ o está combinado para formar un anillo heterocíclico de 4 a 7 miembros, opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆-, haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆ , arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcoxicarbonilo C₁-C₆;

30 L es un alquilenoxi C₁-C₁₀-, que se sustituye opcionalmente con 1-3 sustituyentes seleccionados a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆ -, haloalquilo C₁-C₆-, alcoxi C₁-C₆-, arilalcoxi C₁-C₆-, oxo- y alcoxicarbonilo C₁-C₆-; y

35 A es un perfluoroalquilo C₁-C₃₀;

y en el que un grupo alquilo hace referencia a una porción de hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico.

40 13. Una composición que incluye, al menos, un compuesto de las reivindicaciones 1-10.

14. Un kit para la preparación de un ácido nucleico, que incluye, al menos, un compuesto de las reivindicaciones 1-10 y, al menos, un monómero extensible; y opcionalmente también incluye, al menos, uno de (a), al menos un soporte sólido; (b) al menos un catalizador para su utilización en la extensión del oligonucleótido; (c) al menos un tampón; y (d) al menos un contenedor para empaquetar los componentes del kit.

45

Figura 1. Ciclo de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida

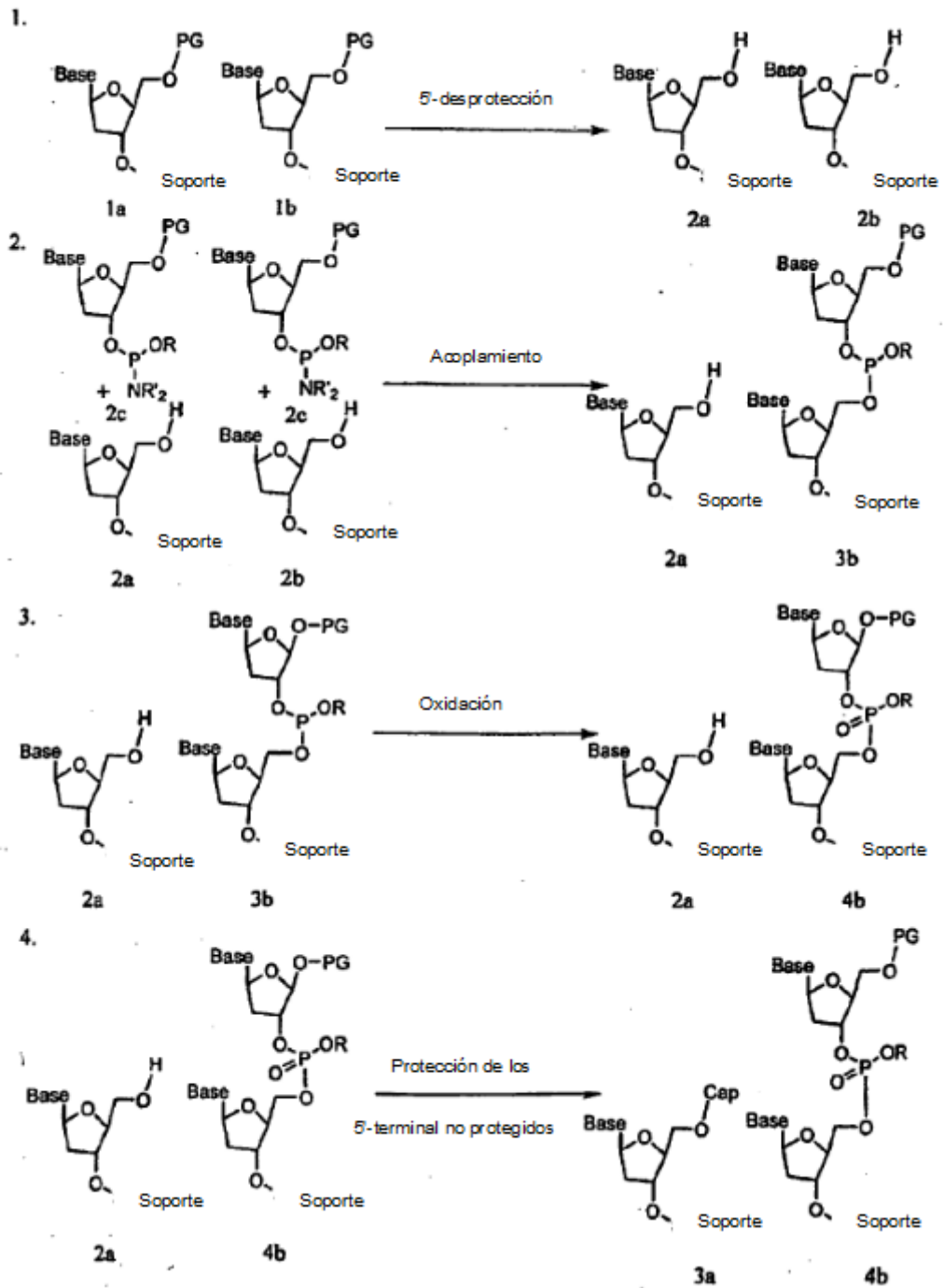


Figura 2. Escisión del soporte sólido

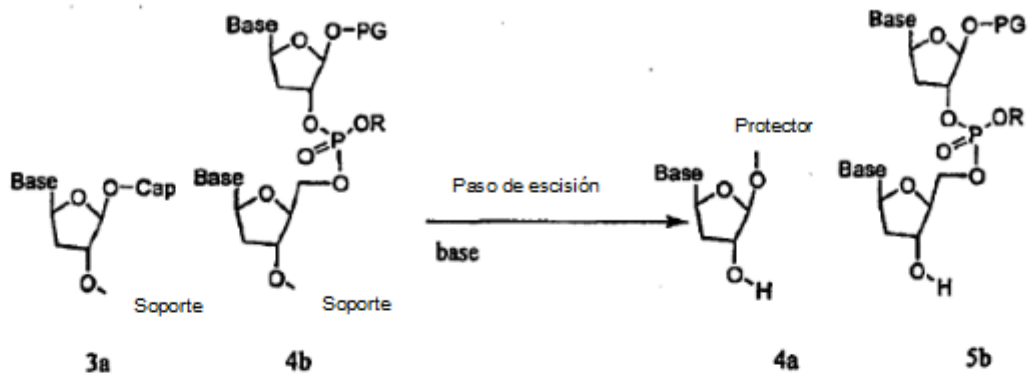


Figura 3. Síntesis del reactivo protector de fosforamidita fluoroso

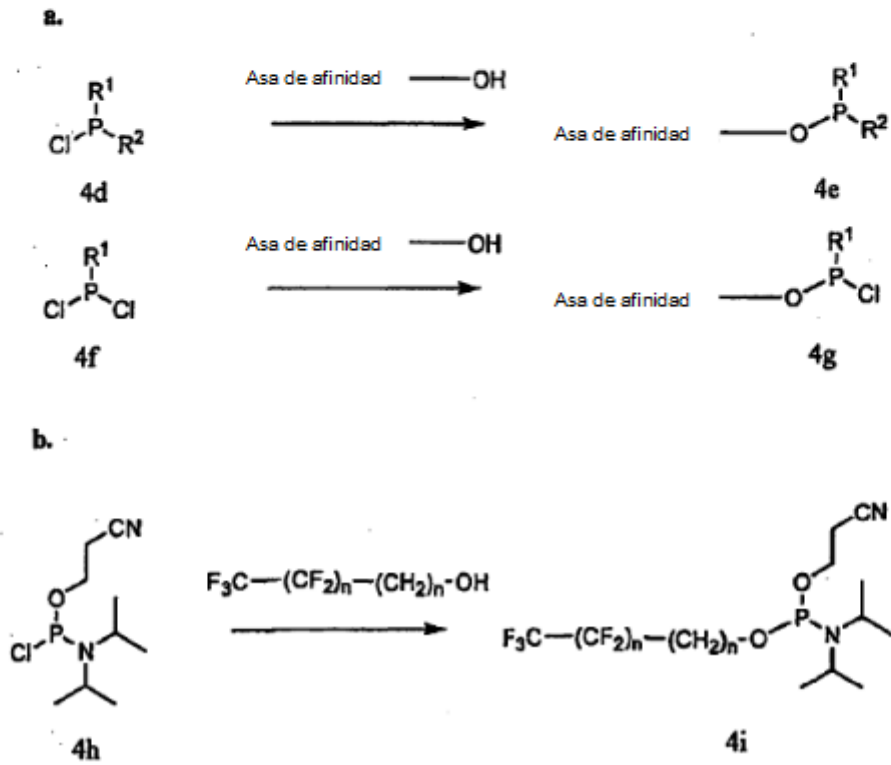


Figura 4. Purificación por afinidad fluorosa

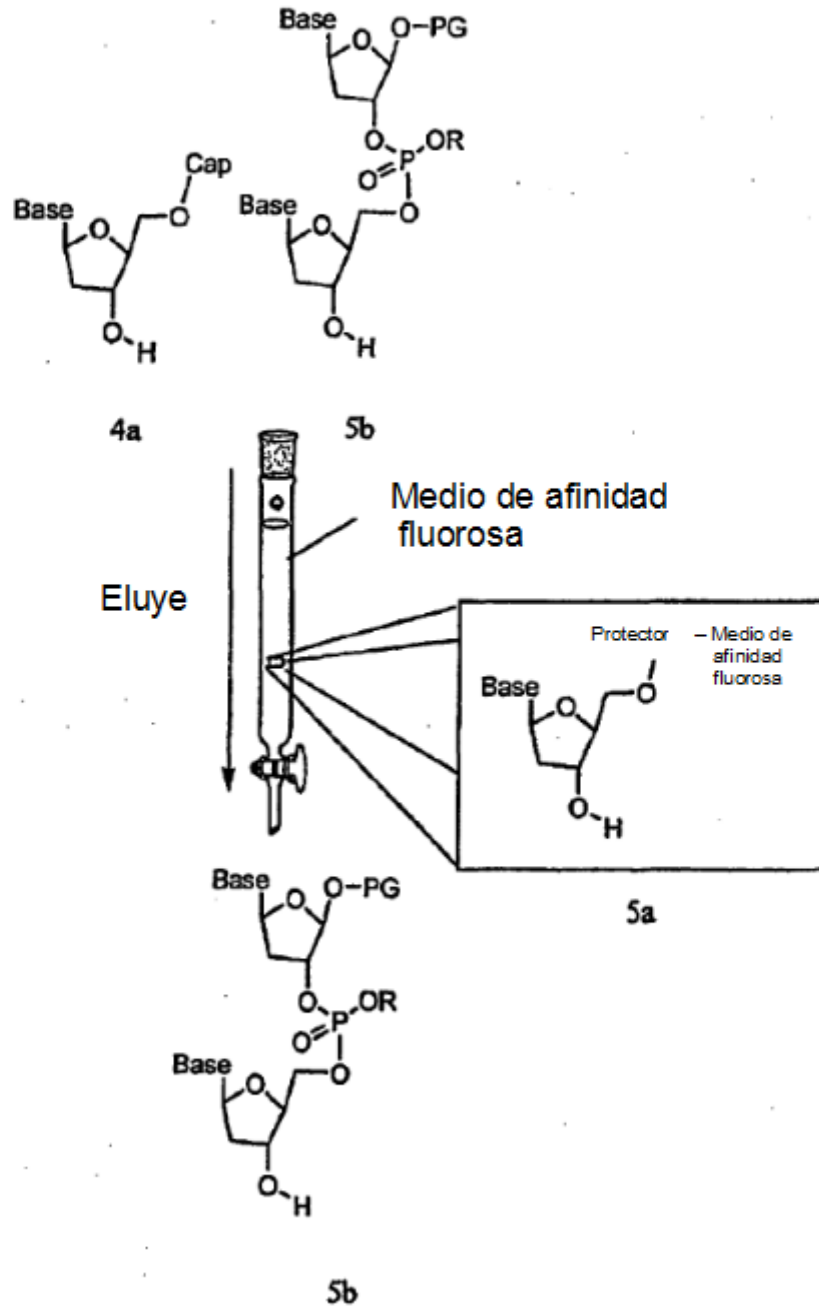


Figura 5. Análisis del producto crudo mediante HPLC

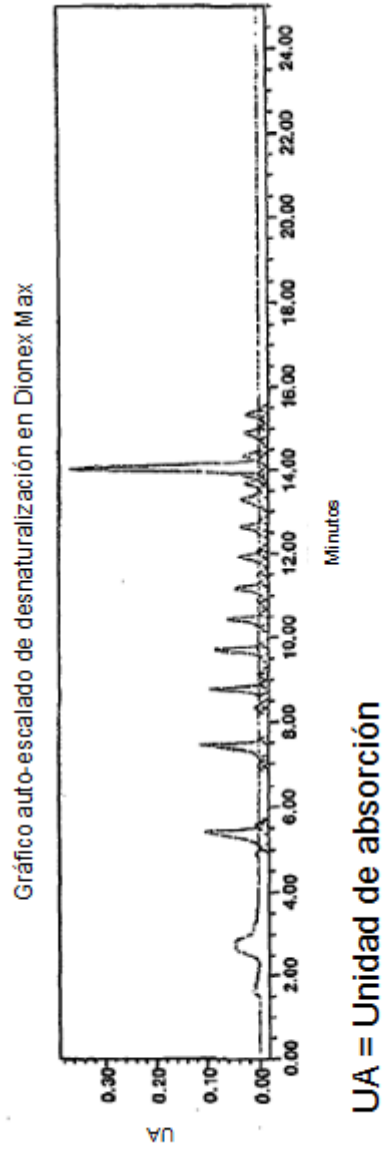


Figura 6. Análisis del filtrado mediante HPLC

Gráfico auto-escalado de desnaturalización en Dionex Max

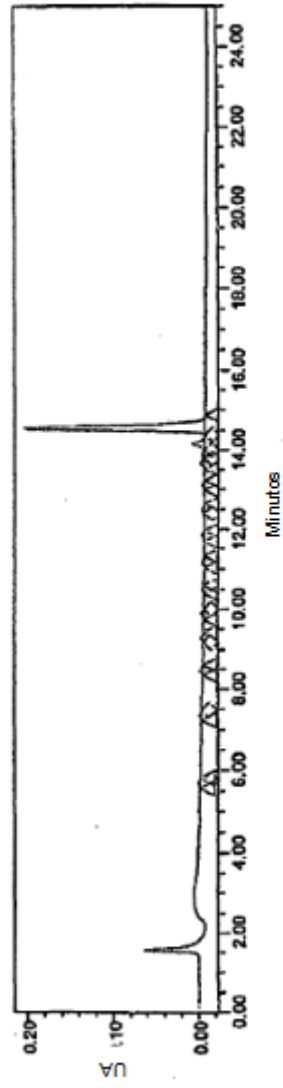


Figura 7. Análisis de las impurezas retenidas mediante HPLC

Gráfico auto-escalado de desnaturalización en Dionex Max

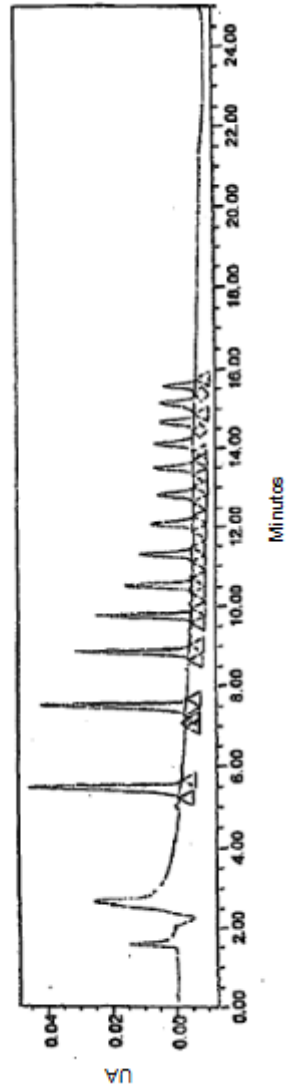


Figura 8. Análisis del filtrado tras NAP-10 mediante HPLC

