

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0609351-5 A2**

(22) Data de Depósito: 06/03/2006
(43) Data da Publicação: 18/10/2011
(RPI 2128)



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

(54) **Título:** MÉTODO PARA PREPARAR UM OLIGONUCLEOTÍDEO, E, USO DE CETONAS

(30) **Prioridade Unionista:** 04/03/2005 EP 05101674.9, 11/03/2005 US 60/660549

(73) **Titular(es):** GIRINDUS AG

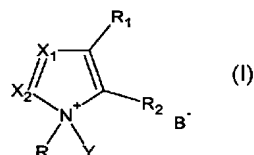
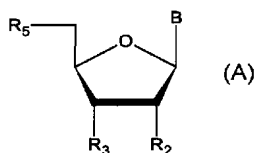
(72) **Inventor(es):** Andreas Hohlfeld, Andreas Schönberger, Christine Kirchhoff, Fritz Link, Meinolf Lange, Olaf Grössel

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2006060489 de 06/03/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2006/094963 de 14/09/2006

(57) **Resumo:** MÉTODO PARA PREPARAR UM OLIGONUCLEOTÍDEO, E, USO DE CETONAS. É descrito um método para preparar um oligonucleotídeo compreendendo as etapas de a) fornecer um composto contendo hidroxila com a fórmula (A), em que B é uma base heterocíclica e i) R_2 é H, um grupo 2'-hidroxila protegido, F, um grupo amino protegido, um grupo O-alkila, um alkila O-substituído, um alquilamino substituído ou uma ligação metileno $C^{4'-O2'}$; R_3 é OR'_3 , NHR''_3 , $NR'''_3R'_3$, em que R_3 é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido, R''_3 , R'''_3 são independentemente grupos protetores amina, e R_5 é OH ou ii) R_2 é H, um grupo 2'-hidroxila protegido, F, um grupo amino protegido, um grupo O-alkila, um alkila O-substituído, um alquilamino substituído ou uma ligação metileno $C4'-O2'$; R_3 é OH e R_5 é OR'_5 e R'_5 é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido ou iii) R_2 é OH, R_3 é OR'_3 , NHR''_3 , $NR'''_3R'_3$, em que R_3 é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido, R''_3 , R'''_3 são independentemente grupos protetores amina, e R_5 é OR'_5 e R'_5 é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido b) reagir o dito composto com um agente de fosfitação na presença de um ativador com a fórmula (I) (ativador I).





PARA PREPARAR UM OLIGONUCLEOTÍDEO, E, USO DE
CETONAS”

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção diz respeito a métodos para preparar
oligonucleotídeos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Oligonucleotídeos são compostos-chaves na ciência da vida
com papéis importantes em vários campos. Eles são, por exemplo, usados
como sondas no campo da análise de expressão genética, como iniciadores em
10 PCR ou para seqüenciamento de DNA.

Além disso, também existem inúmeras aplicações terapêuticas
potenciais incluindo, por exemplo, oligonucleotídeos anti-sentido.

O número crescente de aplicações requer grandes quantidades
de oligonucleotídeos, desta forma, existe uma necessidade contínua de
15 desenvolver melhor método sintético.

Para uma revisão geral ver, por exemplo, "Antisense - From
Technology to Therapy" Blackwell Science (Oxford, 1997).

Um tipo importante de blocos de construção na síntese de
oligonucleotídeos são fosforamiditas; ver, por exemplo, S.L. Beaucage, M. H.
20 Caruthers, Tetrahedron Letters 1859 (1981) 22. Estes fosforamiditas de
nucleosídeos, desoxirribonucleosídeos e derivados destes são comercialmente
disponíveis. Na síntese de fase sólida normal 3 "-O-fosforamiditas são usados,
mas em outros procedimentos sintéticos 5"-O e 2 "-O-fosforamiditas são
usados também. Uma etapa na preparação destes nucleosídeos fosforamiditas
25 é a fosfitilação dos nucleosídeos (protegidos). Depois da fosfitilação as
amiditas preparadas são normalmente isoladas usando métodos de separação
de baixo custo, por exemplo, cromatografia. Depois do isolamento, as
amiditas sensíveis têm que ser armazenadas em condições especiais (por
exemplo, baixa temperatura, ausência de água). Durante o armazenamento, a

qualidade das amiditas pode ser reduzida por certo grau de decomposição e hidrólise. Ambas as reações laterais podem aparecer e os resultados são detectáveis. Mais comumente, o grupo hidroxila e grupos amino e outros grupos funcionais presentes no nucleosídeo são protegidos antes da fosfitação do grupo 3'-, 5'- ou 2'-O hidroxila remanescente.

Estes fosforamiditas são então acoplados aos grupos hidroxila de nucleotídeos ou oligonucleotídeos. O uso da amidita isolado pode resultar em uma hidrólise parcial durante o acoplamento da amidita.

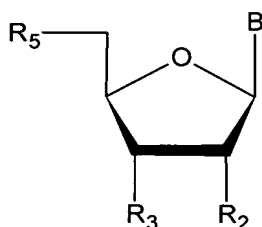
Fosforamiditas são compostos caros. Preços típicos para desoxiamiditas são na faixa de € 40,00 por grama. Os blocos de construção RNA correspondentes são ainda mais caros.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É um objetivo da presente invenção fornecer um método para preparar oligonucleotídeos que supera pelo menos algumas das desvantagens da técnica anterior.

Em uma modalidade, a invenção fornece um método para preparar um oligonucleotídeo compreendendo as etapas de

a) fornecer um composto contendo hidroxila com a fórmula:
em que



B é uma base heterocíclica

e

i) R₂ é H, um grupo 2'-hidroxila protegido, F, um grupo amino protegido, um grupo O-alquila, um alquila O-substituído, um alquilamino substituído ou uma ligação metileno C4'-O2'

R₃ é OR'₃, NHR'₃, NR'₃R''₃, em que R'₃ é um grupo protetor

hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido, R''_3 , R''_3 são independentemente grupos protetores amina,

e R_5 é OH

5 ii) R_2 é H, um grupo 2'-hidroxila protegido, F, um grupo amino protegido, um grupo O-alquila, um alquila O-substituído, um alquilamino substituído ou uma ligação metileno C4'-O2'

R_3 é OH e

R_5 é OR'_5 e R'_5 é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido

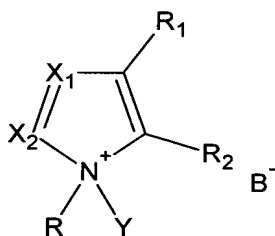
10 ou

iii) R_2 é OH

R_3 é OR'_3 , NHR''_3 , $NR'_3R''_3$, em que R'_3 é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido, R'_3 , R''_3 são independentemente grupos protetores amina, e

15 R_5 é OR'_5 e R'_5 é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido

b) reagir o dito composto com um agente de fosfitilação na presença de um ativador com a fórmula I (ativador I)



em que

20 R = alquila, cicloalquila, arila, aralquila, heteroalquila, heteroarila

R_1 , R_2 = tanto H quanto formam um anel de 5 a 6 membros juntos

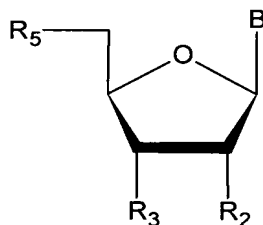
X_1 , X_2 = independentemente tanto N quanto CH

25 Y = H ou $Si(R_4)_3$, com R_4 = alquila, cicloalquila, arila,

aralquila, heteroalquila, heteroarila

B = ácido desprotonado para preparar um composto fosfitilado

c) reagir o dito composto fosfitilado sem isolamento com um segundo composto com a fórmula



5 em que R_5 , R_3 , R_2 , B são independentemente selecionados, mas têm a mesma definição anterior,

na presença de um ativador II selecionado do grupo que consiste em tetrazol, derivados de tetrazol, 4,5-dicianoimidazol, trifluoroacetato de piridínio e misturas destes.

10 De acordo com a invenção o composto fosfitilado é preparado por fosfitilação do grupo hidroxila de um nucleosídeo, um nucleotídeo ou um oligonucleotídeo usando ativadores com fórmula I que são preferivelmente derivados de imidazol.

15 Sem purificação ou isolamento, a fosforamidita sensível preparada é acoplada aos grupos hidroxilas de nucleosídeos, nucleotídeos ou oligonucleotídeos na presença de um ativador II, diferente de ativador I. Não existe isolamento da fosforamidita preparada, nenhuma separação da amidita do ativador I. Preferivelmente, a reação continua no mesmo vaso de reação. Ativador II é usado na presença de ativador I.

20 Os ativadores da técnica anterior para acoplamento de amidita têm uma alta reatividade para a ativação da função amidita. O uso de um ativador como este para fosfitilação também produz certo grau de "sobre-reação" (por exemplo, subproduto 3'-3'). Para superar este e outros problemas a reatividade do ativador é modulada. Neste caso, a reação parará
25 seletivamente no nível de amidita substancialmente sem subprodutos, tal

como subproduto 3'-3'. Somente este resultado (geração *in situ* da amidita) permite continuar a abordagem total iniciando com o acoplamento de amidita.

O ativador II tem a capacidade de induzir a etapa de acoplamento. Depois da adição do ativador II, a amidita iniciará com o acoplamento da amidita.

É possível usar como ativador II todos os ativadores (diferentes dos ativador I) que são capazes de ativar a amidita preparada para reagir com o composto contendo hidroxila da etapa c); isto é, tetrazol e derivados de tetrazol. Derivados preferidos de tetrazol são benzilmercaptotetrazol e etiltiotetrazol (ETT). Compostos adequados são selecionados do grupo que consiste em heterociclos contendo nitrogênio tendo na forma desprotonada hidrogênio ácido, piridina, sais de piridina e misturas destes. Os heterociclos contendo nitrogênio têm uma ligação N^o-H, isto é, N não são protonados. Estes compostos podem ser usados como sais combinando com ácidos, tais como os ácidos H⁺B⁻ em que B⁻ tem o mesmo significado definido nas reivindicações. Um ativador II adequado adicional é piridina, preferivelmente trifluoroacetato de piridínio.

Compostos preferidos são selecionados do grupo que consiste em tetrazol, derivados de tetrazol, 4,5-dicianoimidazol, trifluoroacetato de piridínio e misturas destes.

Depois do acoplamento, são tipicamente usados oxidação (formação de PO) ou sulfurização (formação de PS). Para a formação de PO a abordagem de peróxido é preferida. É possível realizar esta reação sem nenhuma etapa de reação (oxidação de iodo requer poucas etapas de extração).

No caso de sulfurização, é possível usar todos os reagentes conhecidos para sulfurização (isto é, PADS, S-Tetra, beaucage). Um reagente preferido para formação de PS é enxofre. A diferença de custo de produção é em favor do uso de enxofre.

Em uma modalidade, a reação pode ser na presença de acetona.

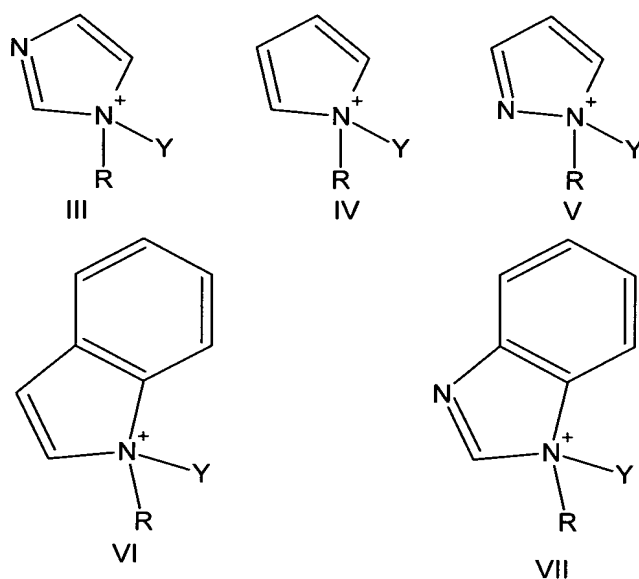
O agente de fosfitilação também ser usado em razão mais ou menos equimolar comparada aos grupos hidroxila do composto contendo
5 hidroxila.

Em uma modalidade adicional, ele pode ser usado em um excesso, por exemplo, 3 a 5 mol/mol de grupos hidroxila no composto contendo hidroxila.

Em uma modalidade preferida adicional, um álcool polimérico
10 é adicionado depois da etapa b) de acordo com a reivindicação 1. Álcoois poliméricos adequados incluem álcool polivinílico (PVA), comercialmente disponível como PVA 145.000 da Merck, Darmstadt. Preferidos são PVA macroporosos com um tamanho de partícula > 120 pm (80 %). Também, membranas com grupos hidroxila ou outros compostos capazes de formar
15 enóis são adequados.

O ativador I pode ser usado estequiometricamente, cataliticamente (3 a 50 mol %, preferivelmente 10 a 30 mol %) ou em excesso.

Em uma modalidade preferida, o ativador I tem a fórmula
20 selecionada do grupo que consiste em



em que

Y é H ou $\text{Si}(\text{R}_4)_3$, com R_4 = alquila, cicloalquila, arila, aralquila, heteroalquila, heteroarila

B = ácido desprotonado

5 R é metila, fenila ou benzila.

A preparação destes ativadores está, por exemplo, descrita em Hayakawa et al, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 8165-8176.

Em uma modalidade o ativador é usado em combinação com um aditivo. Aditivos podem ser selecionados da forma desprotonada dos compostos com fórmula I e outras base heterocíclicas, por exemplo, piridina. Razões adequadas entre o ativador e o aditivo são 1:1 a 1:10.

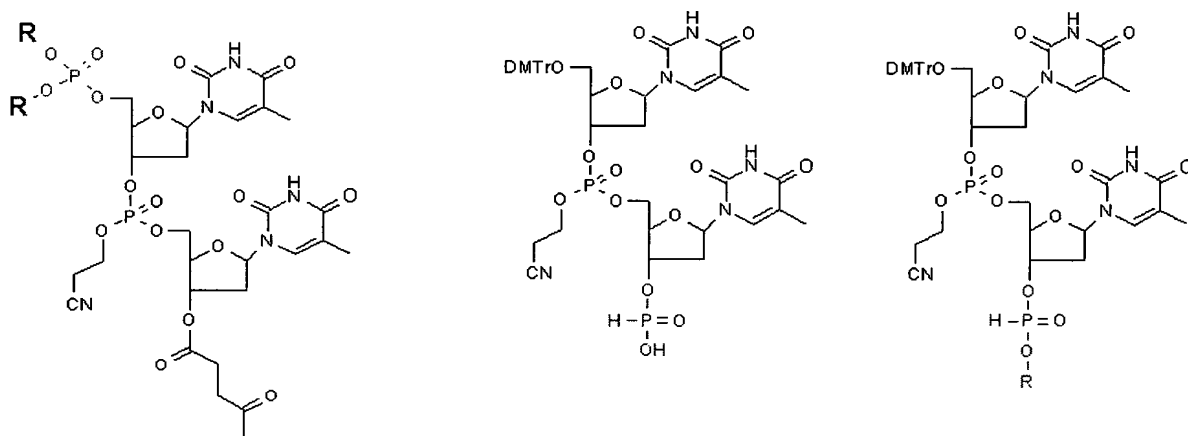
Em uma modalidade preferida, o ativador pode ser preparado seguindo um procedimento "*in situ*". Neste caso, o ativador não será isolado, que resultou em melhores resultados da reação. Hidrólise ou decomposição da molécula alvo é suprimida.

Para uma fosfitilação de alto rendimento na posição 3'- e/ou 5' de oligonucleotídeos (di, tri, tetra, penta, hexa, hepta e octâmeros), a preparação *in situ* do ativador e a combinação com um aditivo são preferidas.

Da forma descrita anteriormente fosfitilação é especialmente usada na síntese de oligonucleotídeos e de fosforamiditas de bloco de

construção. Desta forma, em uma modalidade preferida, o composto contendo hidroxila compreende uma fração de açúcar, por exemplo, um nucleosídeo ou um oligômero derivado destes. Tais nucleosídeos são, por exemplo, adenosina, citosina, guanosina e uracila, desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxittimina, desoxicitosina e derivados destes, opcionalmente compreendendo grupos protetores.

Normalmente, eles serão adequadamente protegidos na sua funcionalidade heterocíclica e nos seus grupos que levam hidroxila exceto o que deve ser fosfitilado. Tipicamente, dimetoxitritila, monometoxitritila ou t-butildimetil-silila (TBDMS) são usados como grupos protetores para o grupo 5' OH, permitindo fosfitilação do grupo 3'-OH. Grupos adicionais possíveis são ésteres de fosfato e H-fosfonatos, ver, por exemplo



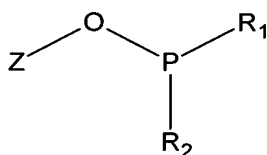
5'-O-Posição 3'-O-Posição 3'-O-Posição

Para éster de fosfato e fosfodiéster, R pode ser selecionado de alquila, arila, alquilarila. Fenila é preferido.

Grupos protetores hidroxila adicionais para 5', 3' e 2' são bem conhecidos na tecnologia, por exemplo, TBDMS.

Em geral, o agente de fosfitilação pode ser o mesmo que nas reações de fosfitilação usando 1-H-tetrazol.

Em uma modalidade preferida, ele tem a fórmula



em que Z representa um grupo de partida por exemplo, -CH₂CH₂CN, -CH₂CH=CHCH₂CN, para-CH₂C₆H₄CH₂CN, -(CH₂)₂-₅N(H)COCF₃, -CH₂CH₂Si(C₆H₅)₂CH₃ ou -CH₂CH₂N(CH₃)COCF₃ e R₁ e R₂ são independentemente grupos amino secundários N(R₃)₂, em que R₃ é alquila com de 1 a cerca de 6 carbonos; ou R₃ é um anel heterocicloalquila ou heterocicloalquenila contendo de 4 a 7 átomos, e com até 3 heteroátomos selecionados de nitrogênio, enxofre, e oxigênio.

Um agente de fosfitilação típico é 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidita.

Outros reagentes de fosfitilação preferidos são derivados de oxazafosfolidina descritos em N. Ok et al., J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 8307 a 8317 incorporado pela referência. Este agente de fosfitilação permite a síntese de oligonucleotídeos em que o internucleotídeo ligado pode ser convertido a fosfortioatos de uma maneira estereoseletiva. Tais ligações de fosfortioato internucleotídicas sintetizadas diastereoseletivas têm impacto promissor no uso de fosfortioatos como medicamentos anti-sentido ou medicamentos imunoestimulantes.

A figura 1 mostra um esquema de reação de acordo com a invenção.

Exemplos adequados de ácidos desprotonados B⁻ são trifluoroacetato, triflato, dicloroacetato, mesila, toсила, o-clorofenolato. Ácidos com um pKa abaixo de 4,5 são preferidos. Preferivelmente, eles têm uma baixa nucleofilicidade.

Em uma modalidade, a reação é conduzida na presença de uma peneira molecular para secar o meio de reação. Em geral, água deve ser excluída ou fixada por um meio de secagem durante a reação.

É possível tanto combinar o ativador I da presente invenção

com o agente de fosfitilação quanto adicionar o componente hidroxila posteriormente. Também é possível combinar o ativador I com o composto contendo hidroxila e adicionar o agente de fosfitilação em seguida.

5 No caso de usar um aditivo, o ativador é misturado com o componente hidroxila antes de o agente de fosfitilação ser adicionado.

Para a geração "*in situ*" do ativador o ácido selecionado é preferivelmente adicionado depois da adição do aditivo em temperatura de reação controlada.

10 O agente de fosfitilação pode ser adicionado antes ou depois da adição do ácido selecionado.

Em relação à adição de ácido e agente de fosfitilação o componente nucleosídeo pode ser adicionado no final ou no início.

15 Em uma modalidade preferida, a base correspondente do ativador, o composto contendo hidroxila, e o agente de fosfitilação são combinados e o ácido é adicionado para iniciar a reação.

O composto fosfitilado (fosforamidita) é então acoplado a um grupo hidroxila de um nucleosídeo, um nucleotídeo ou um oligonucleotídeo na presença de ativador II.

20 Depois da reação com um composto da forma descrita anteriormente, os triésteres preparados são oxidados. Oxidação pode ser usada para preparar ligações de fosfato ou tiofosfato estáveis, por exemplo.

25 Da forma aqui usada, oligonucleotídeos também cobre oligonucleosídeos, análogos de oligonucleotídeo, oligonucleotídeos modificados, nucleotídeo miméticos e similares na forma de RNA e DNA. Em geral, estes compostos compreendem uma espinha dorsal de subunidades monoméricas ligadas onde cada subunidade monomérica ligada é diretamente ou indiretamente anexada a uma fração heterocíclica de base. As ligações que unem as subunidades monoméricas, as subunidades monoméricas e as frações heterocíclica da base podem ser variáveis na estrutura aumentando uma

pluralidade de causas para os compostos resultantes.

A invenção é especialmente usada na síntese de oligonucleotídeos com a fórmula X_n , em que cada X é selecionado de A, dA, C, dC, G, dG, U, dT e $n = 2$ a 30, preferivelmente 2 a 12, mais preferivelmente 2 a 8 ou 2 a 6 e derivados destes compreendendo grupos protetores. Modificações conhecidas na tecnologia são as modificações das bases heterocíclicas, do açúcar ou das ligações que unem as subunidades monoméricas. Variações de ligações de internucleotídeo estão, por exemplo, descritas em WO 2004/011474, começando na parte de baixo da página 11, incorporada pela referência.

Derivados típicos são fosfortioatos, fosforoditioatos, fosfonatos de metila e alquila e derivados de fosfonoaceto.

Modificações típicas adicionais são na fração açúcar. A ribrose tanto é substituída por um açúcar diferente quanto uma ou mais das posições são substituídas com outros grupos, tais como F, O-alquila, S-alquila, N-alquila. Modalidades preferidas são 2'-metila e 2'-metoxietoxi. Todas estas modificações são conhecidas na técnica.

Com relação à fração heterocíclica da base, existem inúmeras outras bases sintéticas que são usadas na tecnologia, por exemplo, 5-metilcitosina, 5-hidróxi-metil-citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6- ou 2-alquila de adenina e guanina, 2-tiouracila. Tais modificações também estão descritas em WO 2004/011474 iniciando da página 21.

Quando usadas na síntese, estas bases normalmente têm grupos protetores, por exemplo, N-6-benziladenina, N-4-benzilacitosina ou N-2-isobutiril guanina. Em geral, todos os grupos reativos que não se destinam a reagir em uma reação adicional têm que ser protegidos, especialmente os grupos hidroxila do açúcar.

Em modalidades relacionadas à síntese de oligonucleotídeos,

usa-se conduzir a reação na presença de aldeídos ou cetonas que podem ser usados tanto como um meio de reação quanto como um co-solvente para outros solventes.

Compostos adequados são os que podem formar enóis.

- 5 Compostos típicos têm a fórmula $R_1R_2C=O$, em que R_1 e R_2 são independentemente H ou consistem em 1 a 20 átomos de carbono que podem formar estruturas cíclicas sozinhos ou R_1 e R_2 formam sistemas cíclicos juntos em que nem R_1 nem R_2 são H. Uma cetona muito preferida é acetona. A presença de acetona termina a atividade de qualquer quantidade de amina,
- 10 tipo diisopropilamina (DIPA), que é liberada durante o processo de fosfitilação. Isto pode ser usado para a fosfitilação de oligonucleotídeos pequenos e grandes com resultados similares (nenhuma decomposição). Outros compostos de cetona com a fórmula $RX-C(=O)-Ry$ em que Rx e Ry são independentemente alquila C_1-C_6 ou formam um cicloalquila junto
- 15 também podem ser usados desde que eles sejam capazes de formar enolatos na presença de, por exemplo, aminas que têm um grupo CH_2- na posição α .

A invenção é adicionalmente explicada pelos seguintes exemplos não limitantes.

Exemplo 1

- 20 *Síntese de 5'-O-DMTr-T-T-3'-O-Lev cianoetil fosfato triéster por meio de preparação in situ de 5'-O-DMTr-T-3'-O-fosforamidita usando trifluoroacetato de metil-imidazólio (MIT)*

- 5,0 g de 5'-O-DMTr-T-3'-OH (9,2 mmol, 1,0 eq.) e 2,34 g de MIT (11,9 mmol, 1,3 eq.) são dissolvidos em 100 mL de diclorometano e 3 g
- 25 de peneira molecular 3A é adicionada e a mistura agitada por 10 min. 3,8 mL de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita (11,9 mmol, 1,3 eq.) são adicionados. A formação do 5'-O-DMTr-T-3'-O-fosforamidita é completa depois de 2 horas. 3,28 g de 5'-OH-T-3'-O-Lev (9,64 mmol, 1,05 eq.) e 51 mL de solução de tetrazol (0,45 M, 22,95 mmol, 2,5 eq) são adicionados e

agitados durante a noite. O triéster de fosfíto resultante é oxidado pela adição de 4,57 g de I₂, 140 mL de THF, 35 mL de piridina e 4 mL de H₂O. A reação é completa depois de 10 min. A mistura de reação é evaporada, dissolvida em 300 mL de diclorometano, extraída com 200 mL de solução de tiosulfato de sódio saturada e então extraída com 200 mL de solução de hidrogeno carbonato de sódio saturada. As camadas aquosas combinadas são extraídas com 30 mL de diclorometano, as camadas orgânicas combinadas são secas em sulfato de magnésio e o solvente é evaporado. Rendimento 9,0 g (espuma incolor): 98 %; Pureza (determinado por HPLC): 84 %.

10 **Exemplo 2**

Síntese de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-T-3' O-Lev cianoetil fosfato triéster por meio de preparação in situ de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-3'-O-fosforamidita usando Trifluoroacetato de metil imidazólio (MIT)

108 mg de MIT (0,56 mmol, 1,5 eq.) e 224 mg de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-3'-OH (0,37 mmol, 1,0 eq.) são dissolvidos em 9 mL de diclorometano e 300 mg de peneira molecular 3A são adicionados. 140 µL de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita (0,44 mmol, 1,2 eq.) são adicionados à solução agitada. A formação do 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-3'-O-fosforamidita é completa depois de 30 min. A mistura é filtrada e 125 mg de 5'-OH-T-3'-O-Lev (0,37 mmol, 1,0 eq.) e 2 mL de solução de tetrazol (0,45 M, 0,9 mmol, 2,4 eq) são adicionados e agitados durante a noite. O triéster de fosfíto resultante é oxidado pela adição de 10 mL de solução de oxidação (254 mg de I₂, 7,8 mL de THF, 1,9 mL de piridina e 222 µL de H₂O). A reação é completa depois de 30 min. Rendimento (determinado por HPLC): 66 %.

25 **Exemplo 3**

Síntese de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-dG^{ie}-3'-O-Lev cianoetil fosforotioato triéster por meio de preparação in situ de 5' O-DMTr-dC^{BZ}-3' O-fosforamidita usando Trifluoroacetato de metil imidazólio (MIT)

2,57 g de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-3'-OH (6,0 mmol, 1,0 eq.) e 1,76 g

de MIT (9,0 mmol, 1,5 eq.) são dissolvidos em 6 mL acetona e 6 mL acetonitrila e 3,0 g de peneira molecular 3A são adicionados. 2,46 mL de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita (7,74 mmol, 1,3 eq.) são adicionados à solução agitada. A formação do 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-3'-O-fosforamidita é completa depois de 30 min. Esta solução é filtrada e adicionada a uma solução de 2,48 g de 5'-OH-G^{iBu}-3'-O-Lev (5,7 mmol, 0,95 eq.) e 2,3 g de benzilmercaptotetrazol (12,0 mmol, 2,0 eq) em 20 mL de diclorometano e 20 mL de acetonitrila e agitada por 30 min. A solução contendo o triéster de fosfito resultante é filtrada e sulfurizada adicionando 14 g de tetratioato ligado ao polímero (25,2 mmol, 4,2 eq.). A reação é completa depois de 16 h. Rendimento (determinado por HPLC): 84 %.

Exemplo 4

Síntese de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-dC^{BZ}-3' O-Lev cianoetil fosforotioato triéster por meio de preparação in situ de 5'-O-DMTr-dG^{BZ}-3'-O-fosforamidita usando 20 Trifluoroacetato de metil imidazólio (MIT)

10 g de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-3'-OH (15,8 mmol, 1,0 eq.) e 7,5 g de MIT (39,5 mmol, 2,5 eq.) são dissolvidos em 30 mL de diclorometano e 30 mL de acetonitrila, 10 g de peneira molecular 3A são adicionados e a mistura agitada por 30 min. 9,0 mL de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita (28,4 mmol, 1,8 eq.) são dissolvidos em 15 mL de diclorometano e 15 mL de acetonitrila. A solução de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-3'-OH e MIT é adicionada gota-a-gota à solução agitada do 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita. A formação do 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-3'-O-fosforamidita é completa depois de 30 min. Esta solução é filtrada e adicionada a uma solução de 5,43 g de 5'-OH-C^{Bz}-3'-O-Lev (12,6 mmol, 0,8 eq.) e 7,6 g de benzilmercaptotetrazol (39,5 mmol, 2,5 eq) em 90 mL de dimetilformamida e 450 mL de acetonitrila e agitada por 10 min. A solução contendo o triéster de fosfito resultante é filtrada e sulfurizada adicionando 50 g de tetratioato ligado ao polímero (90 mmol, 5,7 eq.). A reação é completa

depois de 16 h. Rendimento (determinado por HPLC): 80 %.

Exemplo 5

Síntese de 5'-O-DMTr-dA^{BZ}-dG^{iBu}-3' O-Lev cianoetil fosforotioato triéster por meio de preparação in situ de 5'-O-DMTr-dA^{BZ}-3'-O-fosforamidita usando
 5 *Trifluoroacetato de metil imidazólio (MIT)*

5,0 g de 5'-O-DMTr-dA^{BZ}-3'-OH (5,8 mmol, 1,0 eq.) e 1,8 g de MIT (9,2 mmol, 1,6 eq.) são dissolvidos em 50 mL de acetona e 50 mL de acetonitrila, 2,5 g de peneira molecular 3A são adicionados a mistura agitada por 15 min. 3,0 mL de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita
 10 (9,5 mmol, 1,6 eq.) são adicionados à solução agitada. A formação do 5'-O-DMTr-dA^{BZ}-3'-O-fosforamidita é completa depois de 1 h. Esta solução é filtrada e adicionada a uma solução de 2,22 g de 5'-OH-G^{iBu}-3'-O-Lev (5,1 mmol, 0,94 eq.) e 2,9 g de benzilmercaptotetrazol (15,1 mmol, 2,6 eq) em 25 mL de diclorometano e 25 mL de acetonitrila e agitada por 40 min. A solução
 15 contendo o triéster de fosfito resultante é filtrada e sulfurizada adicionando 2 g de tetratioato ligado ao polímero (3,6 mmol, 3,9 eq.). A reação é completa depois de 16 h. Rendimento (determinado por HPLC): 71 %.

Exemplo 6

Síntese de 5'-O-DMTr-T-dG^{iBu}-3'-O-Lev cianoetil fosforotioato triéster por meio de preparação in situ de 5' O-DMTr-T-3' O-fosforamidita usando
 20 *Trifluoroacetato de metil imidazólio (MIT)*

5,0 g de 5'-O-DMTr-T-3'-OH (9,2 mmol, 1,0 eq.) e 2,7 g de MIT (13,5 mmol, 1,5 eq.) são dissolvidos em 50 mL de acetona e 50 mL de acetonitrila, 2,5 g de peneira molecular 3A são adicionados e a mistura
 25 agitada por 15 min. 3,0 mL de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita (9,5 mmol, 1,03 eq.) são adicionados à solução agitada. A formação do 5'-O-DMTr-T-3'-O-fosforamidita é completa depois de 1 h. Esta solução é filtrada e adicionada a uma solução de 4,44 g de 5'-OH-G^{iBu}-3'-O-Lev (10,2 mmol, 1,1 eq.) e 5,3 g de benzilmercaptotetrazol (27,6

mmol, 1,6 eq) em 50 mL de diclorometano e 50 mL de acetonitrila e agitada por 2 h. A solução contendo o triéster de fosfito resultante é filtrada e sulfurizada adicionando 30 g de tetratioato ligado ao polímero (54 mmol, 5,9 eq.). A reação é completa depois de 16 h. Rendimento (determinado por HPLC): 90 %.

Exemplo 7

Síntese de 5'-O-DMTr-T-dC^{BZ}-dC^{BZ}-dC^{BZ}-3'-O-Lev cianoetil fosforotioato triéster por meio de preparação in situ de 5'-O-DMTr-T-P(S)-dC^{BZ}-3'-O-fosforamidita usando Trifluoroacetato de metil imidazólio (MIT)

100 mg de 5'-O-DMTr-T-P(S)-dC8Z-3'-OH (0,10 mmol, 1,0 eq.) e 24,4 mg de MIT (0,11 mmol, 1,1 eq.) são dissolvidos em 10 mL diclorometano, 200 mg de peneira molecular 4A são adicionados. 32 µL de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita (0,10 mmol, 1,0 eq.) são adicionados à solução agitada. A formação do 5'-O-DMTr-T-P(S)-dC^{BZ}-3'-O-fosforamidita é completa depois de 24 h. 82 mg de 5'-OH-dC^{BZ}-3'-P(S)-dC^{BZ}-3'-O-Lev (0,09 mmol, 0,9 eq.) e 366 µL de solução de tetrazol (0,45 M, 0,16 mmol, 1,6 eq) são adicionados e agitados por 45 h. O triéster de fosfito resultante é sulfurizado adicionando 400 mg de tetratioato ligado ao polímero em 72 h. Rendimento (determinado por HPLC): 58 %.

Exemplo 8

Síntese de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-dG^{iBu}-dC^{BZ}-dC^{BZ}-3'-O-Lev cianoetil fosforotioato triéster por meio de preparação in situ de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-P(S)-dG^{iBu}-3'-O-fosforamidita usando Trifluoroacetato de metil imidazólio (MIT)

100 mg de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-P(S)-dG^{iBu}-3'-OH (0,09 mmol, 1,0 eq.) e 17,8 mg de MIT (0,09 mmol, 1,0 eq.) são dissolvidos em 10 mL de diclorometano, 200 mg de peneira molecular 4A são adicionados. 28 µL de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita (0,09 mmol, 1,0 eq.) são adicionados à solução agitada. A formação do 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-P(S)-dG^{iBu}-3'-O-fosforamidita é completa depois de 3 h. 40 mg de 5'-OH-dC^{BZ}-3'-P(S)-

dC^{BZ}-3'-O-Lev (0,04 mmol, 0,5 eq.) e 0,9 mL de etilíio solução de tetrazol (0,25 M, 0,23 mmol, 2,5 eq.) são adicionados e agitados por 2 h. O triéster de fosfito resultante é sulfurizado adicionando 200 mg de tetratioato ligado ao polímero em 72 h. Rendimento 30 mg (14,1 µmol, cristais brancos): 16 %;

5 Pureza (determinada por HPLC): 67 %.

Exemplo 9

Síntese de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-dC^{BZ}-dA^{BZ}-T-3' O-Lev cianoetil fosforotioato triéster por meio de preparação in situ de 5' O-DMTr-dC^{BZ}-P(S)-dC^{BZ}-3' O-fosforamidita usando Trifluoroacetato de benzil imidazólio (BIT)

10 100 mg de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-P(S)-dC^{BZ}-3'-OH (0,09 mmol, 1,0 eq.) e 46 mg de BIT (0,17 mmol, 1,9 eq.) são dissolvidos em 5 mL de acetona e 5 mL de acetonitrila, 500 mg de peneira molecular 3A são adicionados. 58 µL de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita (0,14 mmol, 1,5 eq.) são adicionados à solução agitada. A formação do 5'-O-

15 DMTr-dC^{BZ}-P(S)-dC^{BZ}-3'-O-fosforamidita é completa depois de 1 h. 41,3 mg de 5'-OH-dA^{BZ}-3'-P(S)-T-3'-O-Lev (0,05 mmol, 0,55 eq.) e 43,7 mg de benzilmercaptotetrazol (0,23 mmol, 2,5 eq.) são adicionados e agitados por 1.5 h. O triéster de fosfito resultante é sulfurizado adicionando 500 mg de tetratioato ligado ao polímero em 72 h. Rendimento (determinado por HPLC):

20 70 %.

Exemplo 10

Síntese de 5'-O-DMTr-dG^{iBu}-dG^{iBu}-dG^{iBu}-T-dG^{iBu}-dG^{iBu}-3'-O-Lev cianoetil fosfato triéster por meio de preparação in situ de 5' O-DMTr-dG^{iBu}-P(O)-dG^{iBu}-3' O-fosforamidita usando Trifluoroacetato de metil imidazólio (MIT)

25 200 mg de 5'-O-DMTr-dG^{iBu}-P(O)-dG^{iBu}-3'-OH (0,18 mmol, 1,0 eq.) e 56 mg de MIT (0,27 mmol, 1,5 eq.) são dissolvidos em 5 mL de acetona e 300 mg de peneira molecular são adicionados. 128 µL de 2-cianoetil N,N,N',N'-tetraisopropilfosfordiamidita (BisPhos) (0,4 mmol, 2,2 eq.) são adicionados à solução agitada. A formação do 5'-O-DMTr-dG^{iBu}-3'-P(O)-

dG^{iBu}-3'-O-fosforamidita é completa depois de 15 min. 156 mg de 5'-OH-dG^{iBu}-T-dG^{iBu}-dG^{iBu}-3'-O-Lev (0,09 mmol, 1,0 eq.) e 87 mg de benzilmercaptotetrazol (0,46 mmol, 5,0 eq) são adicionados e agitados por 20 min. O triéster de fosfito resultante é oxidado pela adição de 3,7 mL de solução de oxidação (94 mg de I₂, 2,9 mL de THF, 0,7 mL de piridina e 82 µL de H₂O). A reação é completa depois de 30 min. Rendimento (determinado por HPLC): 51 %.

Exemplo 11

Síntese de 5'-O-DMTr-dG^{iBu}-T-3' O-Lev cianoetil fosfato triéster

200 g (312 mmol) de DMTr-dG^{iBu}-3'-OH e 80 g (408 mmol) de MIT são dissolvidos em 400 mL de diclorometano e 400 mL de acetona. 200 g de peneira molecular e 89 mL (1,25 mol) de NMI (N-metil-imidazol) são adicionados. Em 15 °C, 109 mL (344 mmol) de BisPhos são adicionados à solução agitada. A formação do 5'-ODMTr-dG^{iBu}-3'-O-fosforamidita é completa depois de 10 min. e a solução é agitada naturalmente por mais 30 min. 88,4 g (260 mmol) de 5'-OH-T-3'-O-Lev e 83,4 g (624 mmol) de ETT são dissolvidos com 600 mL de acetona e 600 mL de diclorometano. 100 g de peneira molecular e 86 mL (1,08 mol) de NMI são adicionados. À esta solução agitada 800 mL da solução de fosforamidita são adicionados. A reação é completa depois de 10 min e 46 mL de solução de peróxido de butanona (Curox M400) são adicionados à mistura resfriada (banho de gelo). A reação é completa depois de 5 min. Conversão (determinada por HPLC): 100 %.

Exemplo 12

Síntese de 5'-O-DMTr-dG^{iBu}-T-3' O-Lev cianoetil fosforotioato triéster

1,0 g (1,56 mmol) de DMTr-dG^{iBu}-3'-OH e 368 mg (1,88 mmol) de MIT são dissolvidos em 3 mL de diclorometano e 3 mL de acetona. 1 g de peneira molecular e 154 µL (1,25 mol) de NMI são adicionados. Em 15 °C, 594 µL (1,87 mmol) de BisPhos são adicionados à solução agitada. A

formação do 5'-O-DMTr-dG^{iBu}-3'-O-fosforamidita é completa depois de 10 min. e a solução é agitada naturalmente por mais 30 min. 438 mg (1,29 mmol) de 5'-OH-T-3'-O-Lev e 396 mg (3,07 mmol) de ETT são dissolvidos com 5 mL de acetona e 5 mL de diclorometano. 1 g de peneira molecular e 248 mL (3,61 mol) de NMI são adicionados. À esta solução agitada 5,5 mL da solução de fosforamidita são adicionados. A reação é completa depois de 10 min e

A) 25 mg (7,8 mmol) de enxofre (S₈) e 2,5 mg de Na₂Sx9H₂O são adicionados. A reação é completa depois de 10 min. Conversão (determinada por HPLC): 100 %

B) 25 mg (7,8 mmol) de enxofre (S₈) são adicionados. A reação é completada depois de 3 h. Conversão 99 %.

Exemplo 13

Síntese de 5'-O-DMTr-T-dC^{Bz}-dG^{iBu}-T-T-dG^{iBu}-3'-O-Lev cianoetil fosforotioato triéster

5,0 g (4,9 mmol) de DMTr-T-dC^{BZ}-3'-OH e 2,4 g (12,3 mmol) de MIT são dissolvidos em 10 mL de diclorometano e 10 mL de acetona. 8 g de peneira molecular e 980 µL (12,3 mol) de NMI são adicionados. Em 15 °C, 3,13 mL (9,85 mmol) de BisPhos são adicionados à solução agitada. A formação do 5'-O-DMTr-T-dC^{BZ}-3'-O-fosforamidita é completa depois de 10 min. e a solução é agitada naturalmente por mais 30 min. 100 mL de heptano foram adicionados, decantados e 10 mL de diclorometano e 10 mL de acetona foram adicionados ao resíduo resultante. 4,44 g (2,79 mmol) de 5'-OH-dG^{iBu}-T-T-dG^{iBu}-3'-O-Lev e 1,05 g (8,06 mmol) de ETT são dissolvidos com 15 mL de acetona e 15 mL de diclorometano. 5 g de peneira molecular e 640 µL (8,06 mol) de NMI são adicionados. À esta solução agitada 20 mL da solução de fosforamidita são adicionados. A reação é completa depois de 10 min e 930 mg (3,09 mmol) de PADS são adicionados. A reação é completa depois de 10 min. Conversão (determinada por HPLC) 92 %.

Exemplo 14

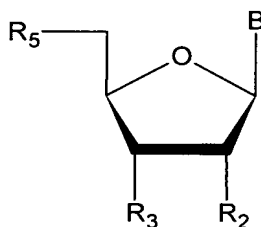
Síntese de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-dA^{Bz}- dC^{BZ}-dA^{BZ}-dC^{BZ}-dA^{BZ}- dC^{BZ}-dA^{BZ}-3'-O-Lev cianoetil fosfato triéster

860 mg (0,45 mmol) de 5'-O-DMTr-dC^{BZ}-dA^{BZ}- dC^{BZ}-dA^{BZ}-3'-OH e 133 mg (0,67 mmol) de MIT são dissolvidos em 3 mL de diclorometano e 3 mL de acetona. 800 mg de peneira molecular e 55 µL (69 mol) de NMI são adicionados. 214 µL (0,65 mmol) de BisPhos são adicionados à solução agitada. A formação do 5'-O-DMTrdC^{BZ}-dA^{BZ}- dC^{BZ}-dA^{BZ}-3'-3'-O-fosforamidita é completa depois de 10 min. e a solução é agitada naturalmente por mais 20 min. 30 mL de heptano foram adicionados, decantados e 5 mL de diclorometano e 5 mL de acetona foram adicionados ao resíduo resultante. 545 mg (0,3 mmol) de 5'-OH-dG^{iBu}-T-T-dG^{iBu}-3'-O-Lev e 117 mg (0,9 mmol) de ETT são dissolvidos com 3 mL de acetona, 3 mL de diclorometano e 0,3 mL de DMF. 1 g de peneira molecular e 70 µL (0,9 mmol) de NMI são adicionados. À esta solução agitada 8 mL da solução de fosforamidita são adicionados. A reação é completa depois de 30 min e 70 µL de solução de peróxido de butanona (Curox M400) são adicionados à mistura. A reação é completa depois de 10 min. Conversão (determinada por HPLC): 80 %.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar um oligonucleotídeo, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) fornecer um composto contendo hidroxila com a fórmula:



5 em que

B é uma base heterocíclica e

i) R_2 é H, um grupo 2'-hidroxila protegido, F, um grupo amino protegido, um grupo O-alquila, um alquila O-substituído, um alquilamino substituído ou uma ligação metileno $C4'-O2'$,

10 R_3 é OR'_3 , NHR''_3 , $NR'''_3R''''_3$, em que R'_3 é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido, R''_3 , R'''_3 são independentemente grupos protetores amina,

e R_5 é OH

ou

15 ii) R_2 é H, um grupo 2'-hidroxila protegido, F, um grupo amino protegido, um grupo O-alquila, um alquila O-substituído, um alquilamino substituído ou uma ligação metileno $C4'-O2'$,

R_3 é OH e

20 R_5 é OR'_5 e R'_5 é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido,

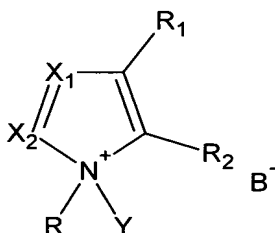
ou

iii) R_2 é OH

25 R_3 é OR'_3 , NHR''_3 , $NR'''_3R''''_3$, em que R'_3 é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido, R''_3 , R'''_3 são independentemente grupos protetores amina, e

R_5 é OR'_5 e R'_5 é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido,

b) reagir o dito composto com um agente de fosfitilação na presença de um ativador com a fórmula I (ativador I)



5 em que,

R = alquila, cicloalquila, arila, aralquila, heteroalquila, heteroarila,

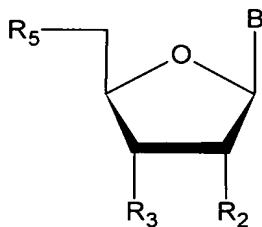
R_1, R_2 = tanto H quanto formam um anel de 5 a 6 membros juntos

10 X_1, X_2 = independentemente tanto N quanto CH,

$Y = H$ ou $Si(R_4)_3$, com R_4 = alquila, cicloalquila, arila, aralquila, heteroalquila, heteroarila,

B^- = ácido desprotonado para preparar um composto fosfitilado,

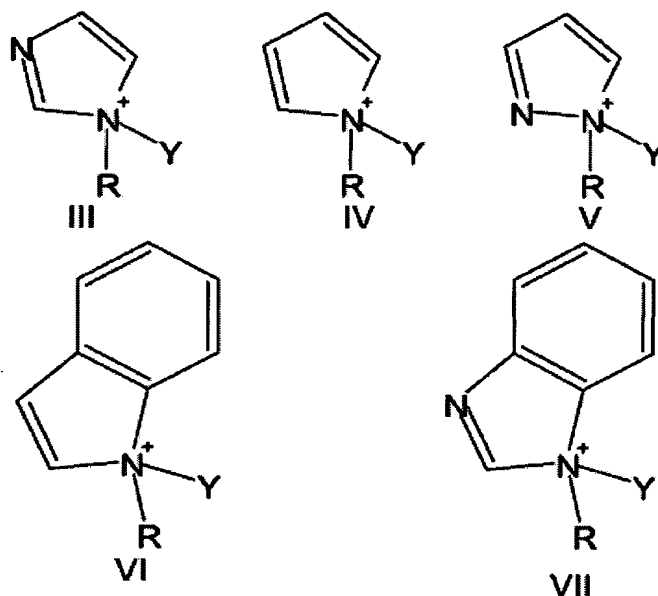
15 c) reagir o dito composto fosfitilado sem isolamento com um segundo composto com a fórmula



em que R_5, R_3, R_2, B são independentemente selecionados, mas têm a mesma definição anterior na presença de um ativador II diferente de ativador I.

20 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o ativador de fórmula I tem uma fórmula selecionada do grupo

que consiste em



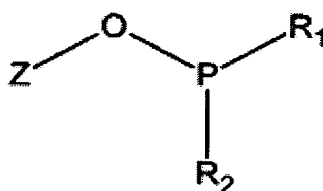
em que

Y é da forma definida na reivindicação 1,

R é metila, fenila ou benzila.

5

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o agente de fosfitilação tem a fórmula II



em que Z representa um grupo de partida e R₁ e R₂ são independentemente grupos amino secundários.

10 4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o agente de fosfitilação é 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforodiamidita.

15 5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o ácido desprotonado é derivado do grupo que consiste em ácido trifluoroacético, ácido dicloroacético, ácido metanossulfônico, ácido trifluorometanossulfônico, clorofenolato.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a reação é na presença de acetona.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o agente de fosfitilação é usado na quantidade de 1,0 a 1,2 mol/mol de grupos hidroxilas no composto contendo hidroxila.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o agente de fosfitilação é usado na quantidade de 3 a 5 mol/mol de grupos hidroxila no composto contendo hidroxila.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que um álcool polimérico é adicionado depois da etapa b), de acordo com a reivindicação 1.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o álcool polimérico é álcool polivinílico.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o ácido desprotonado é derivado do grupo que consiste em ácido trifluoroacético, ácido dicloroacético, ácido metanossulfônico, ácido trifluorometanossulfônico (triflato), clorofenolato e misturas destes.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a reação é na presença de acetona.

13. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que pelo menos 95 % (p/p) do meio de reação são acetona.

14. Uso de cetonas com a fórmula $RX-C(=O)-R_y$, em que R_x e R_y são independentemente alquila C_1-C_6 ou formam um cicloalquila junto, caracterizado pelo fato de ser como um meio de reação ou co-solvente na síntese de oligonucleotídeos.

15. Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a cetona é acetona, butanona, pentanona, hexanona, ciclohexanona ou uma mistura destes.

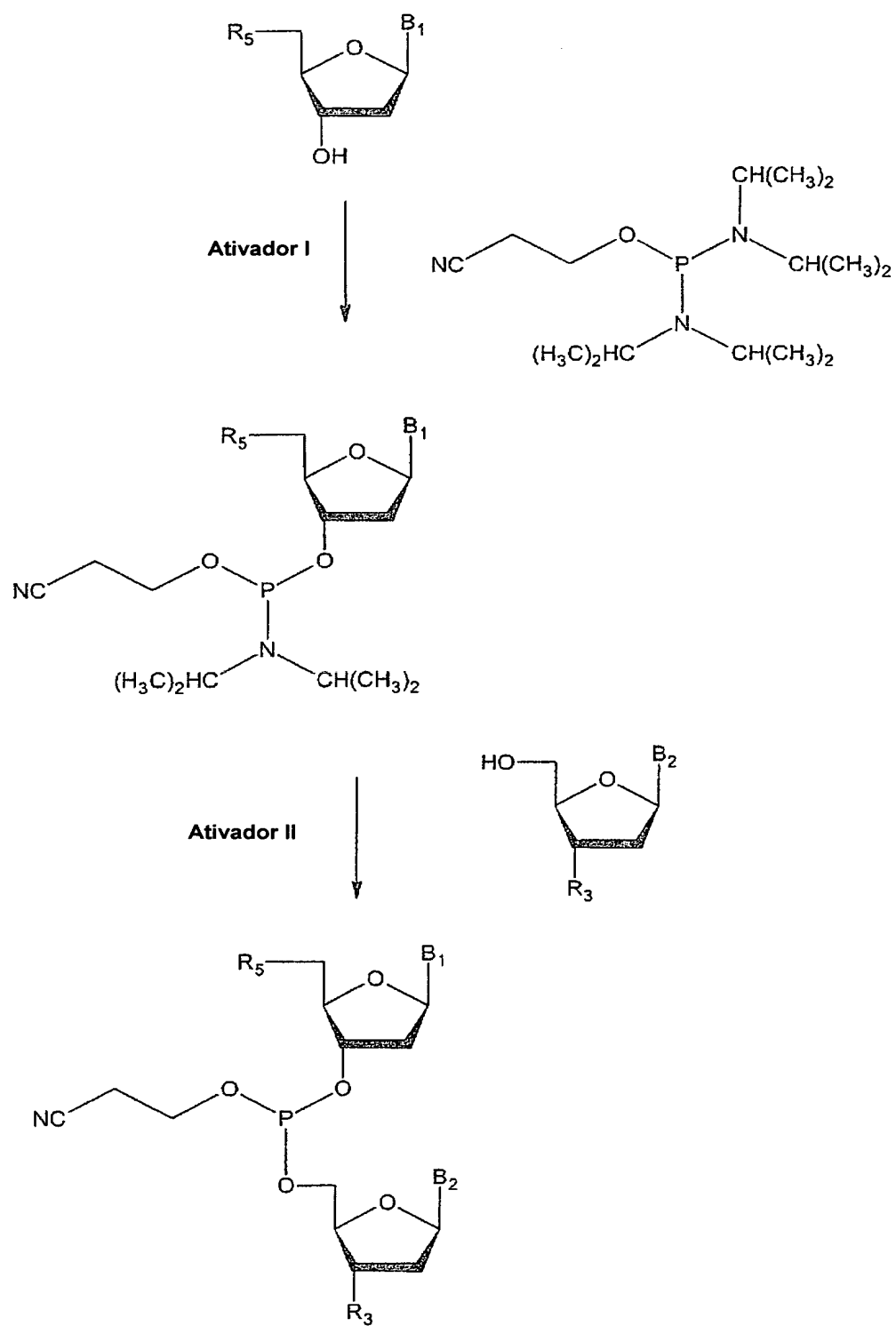
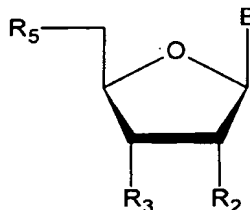


Fig 1

RESUMO

“MÉTODO PARA PREPARAR UM OLIGONUCLEOTÍDEO, E, USO DE CETONAS”

É descrito um método para preparar um oligonucleotídeo compreendendo as etapas de a) fornecer um composto contendo hidroxila com a fórmula (A),



em que B é uma base heterocíclica e i) R₂ é H, um grupo 2'-hidroxila protegido, F, um grupo amino protegido, um grupo O-alquila, um alquila O-substituído, um alquilamino substituído ou uma ligação metileno C4'-O2'; R₃ é OR'₃, NHR''₃, NR''₃R'₃, em que R₃ é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido, R''₃, R'₃ são independentemente grupos protetores amina, e R₅ é OH ou ii) R₂ é H, um grupo 2'-hidroxila protegido, F, um grupo amino protegido, um grupo O-alquila, um alquila O-substituído, um alquilamino substituído ou uma ligação metileno C4'-O2'; R₃ é OH e R₅ é OR'₅ e R'₅ é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido ou iii) R₂ é OH, R₃ é OR'₃, NHR''₃, NR''₃R'₃, em que R₃ é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido, R''₃, R'₃ são independentemente grupos protetores amina, e R₅ é OR'₅ e R'₅ é um grupo protetor hidroxila, um nucleotídeo protegido ou um oligonucleotídeo protegido b) reagir o dito composto com um agente de fosfitilação na presença de um ativador com a fórmula (I) (ativador I)

